

Tesina de Grado  
Licenciatura en Ciencias Biológicas  
Profundización en Neurociencias

**REINERVACION SIMPÁTICA DEL ENDOMETRIO TRANSPLANTADO A LA  
CÁMARA ANTERIOR DEL OJO: APORTES AL CONTROL NEURAL DE LA  
ENDOMETRIOSIS**

**2012**

Estudiante: Bach. Patricia Silveira

Tutor: Dra. Mónica Brauer

Laboratorio de Biología Celular, IIBCE

Montevideo- Uruguay

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a Mónica, mi tutora, quien ha sido mi guía en este largo proceso de aprendizaje. Agradecer especialmente la constante dedicación que me ha brindado.

A Paola y Analía, quienes con su incontable ayuda han logrado allanarme el camino.

A todos mis compañeros de laboratorio, M<sup>a</sup> Noel, Ximena, José, Martín, Camila, Jessika, Cecilia y especialmente a Gaby, con quienes no solo he compartido largas jornadas de trabajo en el laboratorio sino también divertidas charlas acompañadas de un mate.

A mi familia, que si bien todavía no han logrado entender bien lo que hago siempre han estado presentes para darme aliento en los momentos difíciles.

A todos ellos mi más profundo agradecimiento.

Este trabajo fue parcialmente realizado dentro del marco de la Beca de Iniciación a la investigación financiada por la ANII-Uruguay.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	Pág.1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	Pág. 3
1. Rasgos anatómicos y fisiológicos del útero.....	Pág. 4
2. Endometriosis.....	Pág. 9
3. Etiología de la endometriosis.....	Pág. 12
4. Modelos experimentales para el estudio de la endometriosis.....	Pág. 14
5. El dolor de la endometriosis – Papel de la inervación.....	Pág. 16
6. Posible contribución del ambiente peritoneal a la reinervación simpática de los focos endometrióticos.....	Pág. 19
7. La cámara anterior del ojo.....	Pág. 21
<b>OBJETIVOS</b> .....	Pág. 22
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	Pág. 22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	Pág. 23
1. Animales.....	Pág. 24
2. Transplante de endometrio a la cámara anterior del ojo.....	Pág. 24
2.1 Preparación de los transplantes.....	Pág. 24
2.2 Transplante de los tejidos a la cámara anterior del ojo.....	Pág. 24
3. Preparación de los úteros para inmunohistoquímica e histología.....	Pág. 25
4. Demostración de la inervación simpática.....	Pág. 25
5. Evaluación cuantitativa de la inervación simpática.....	Pág. 26
5.1 Transplantes.....	Pág. 26
5.2 Cuerno uterino.....	Pág.27
6. Estadística.....	Pág. 28

**RESULTADOS**.....Pág. 29

1. Evolución de los trasplantes en la cámara anterior del ojo.....Pág. 30
2. Reinervación simpática de los trasplantes en la CAO.....Pág. 31
3. Inervación simpática del endometrio eutópico.....Pág. 36
4. Comparación con la reinervación de los trasplantes de endometrio a la CAO con la del endometrio eutópico.....Pág. 38

**DISCUSIÓN**.....Pág. 39

1. Evolución de los trasplantes en la cámara anterior del ojo.....Pág. 40
2. Reinervación simpática de los trasplantes en la CAO.....Pág. 42
3. Inervación simpática del endometrio eutópico.....Pág. 43
4. Comparación de la reinervación de los trasplantes de endometrio a la CAO con la del endometrio eutópico.....Pág. 44
5. Regulación de la reinervación de los trasplantes endometriales en la CAO.....Pág. 45

**CONCLUSIONES**.....Pág. 47

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**.....Pág. 48

**RESUMEN**

La endometriosis es una enfermedad crónica definida por la presencia de crecimientos funcionales de endometrio fuera de la cavidad uterina. Es una patología dependiente del estrógeno que afecta a las mujeres en edad reproductiva y se caracteriza por dolor pélvico crónico e infertilidad. Estudios recientes han mostrado que los crecimientos endometrióticos ectópicos humanos y experimentales están profusamente inervados. En particular, se ha observado que los nervios simpáticos jugarían un papel relevante en la sintomatología de esta patología, pero se desconoce qué factores regulan la reinervación del endometrio en localizaciones ectópicas.

Se ha postulado que el ambiente peritoneal y las células inflamatorias que infiltran los endometriomas peritoneales favorecerían la reinervación de estas estructuras, sin embargo no se conoce en profundidad cual es su relevancia. Con el fin de evaluar la capacidad de reinervación simpática del tejido endometrial fuera de la influencia del ambiente peritoneal, en el presente trabajo se transplantaron fragmentos de endometrio de rata a la cámara anterior del ojo (CAO). La CAO fue elegida como sitio de trasplante dado que es un territorio inmunológicamente privilegiado, carente del proceso inflamatorio observado en el peritoneo de las pacientes afectadas por la endometriosis.

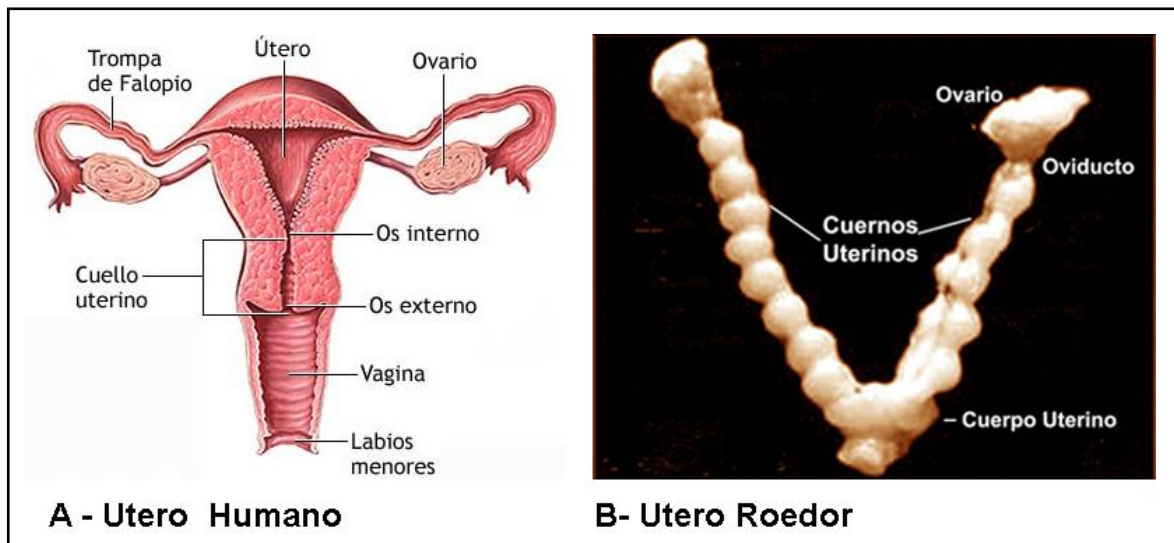
El examen histológico de los trasplantes mostró que, al igual que otros tejidos, el endometrio aislado es capaz de sobrevivir y mantener su estructura en la cámara anterior del ojo, lo que abre interesantes posibilidades respecto de la utilización de la CAO como sitio alternativo de trasplante para los estudios de endometriosis experimental. Nuestros estudios mostraron también que los trasplantes intraoculares de endometrio eran reinervados organotípicamente por los nervios simpáticos, lo que indicaría que el endometrio posee la capacidad intrínseca de atraer y sostener el crecimiento de los nervios simpáticos fuera de su localización natural. En este marco, los datos obtenidos sugieren que el ambiente peritoneal y el proceso inflamatorio desencadenado por la presencia de los endometriomas, no serían imprescindibles para que ocurra la reinervación del endometrio en localizaciones ectópicas.

Los trasplantes endometriales a la CAO mostraron la presencia de algunas células inflamatorias, tales como los macrófagos. Esto genera la posibilidad de que los factores neurotróficos producidos por estas células contribuyan a la reinervación de los trasplantes en la CAO. Estudios posteriores serán necesarios para evaluar los factores que regulan la inervación del endometrio eutópico y su reinervación en localizaciones ectópicas durante el curso de la endometriosis.

ANTECEDENTES

## 1. Rasgos anatómicos y fisiológicos del útero

En los humanos y algunos primates, el útero presenta una porción superior ancha, denominada cuerpo, y caudalmente se estrecha dando lugar a la región denominada *cervix* o cuello uterino. En su parte superior, el cuerpo uterino se continua en dos estructuras tubulares, las Trompas de Falopio, cuyos extremos distales se abren hacia la cavidad peritoneal muy cerca de los ovarios. Los ovarios, son una pareja de glándulas ubicadas a ambos lados del útero, que aunque no forman parte del mismo, participan en su fisiología (Guyton & Hall, 2006) (Fig. 1a).



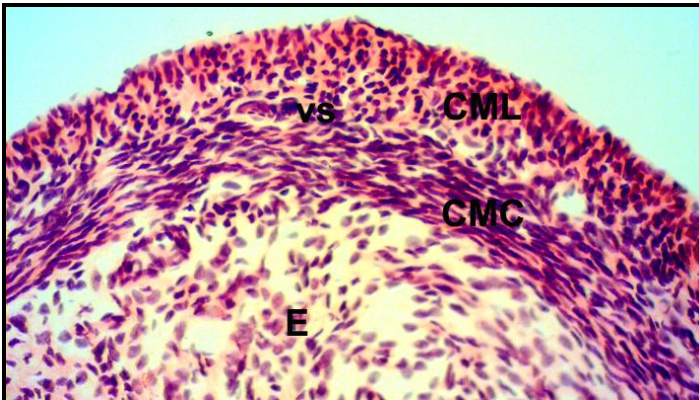
**Figura 1.** Anatomía general del útero. **A:** esquema de un corte longitudinal del útero humano, donde se muestra la estructura uterina y su relación con los restantes componentes del tracto genital femenino. **B:** fotografía del útero bicorne de los roedores, los ensanchamientos observados en el útero representan los embriones en desarrollo.

En otras especies de mamífero, tales como los roedores, el útero presenta dos cuernos uterinos los cuales convergen caudalmente para formar el cuerpo y el cuello uterino (Fig. 1b). Estas diferencias interespecíficas se originan durante el desarrollo embrionario. En todas las especies, el útero se desarrolla a partir de dos conductos de Müller bilaterales, sin embargo, mientras que en algunas especies el útero se mantiene como dos conductos individuales, en los humanos éstos se fusionan en un cuerpo único. Estas diferencias en el desarrollo se verán reflejadas en la organización histológica del útero, particularmente en su musculatura.



Histológicamente, la pared uterina está compuesta por dos compartimientos, el miometrio y el endometrio. En los humanos el miometrio consta de tres capas de músculo liso. En la capa más externa, las fibras musculares se disponen de manera trasversal y diagonalmente, envolviendo al útero. Las fibras de la capa intermedia se organizan con un patrón más azaroso, corriendo en forma longitudinal, trasversal y oblicua. En la más interna, las fibras musculares se disponen siguiendo un patrón circular que parece ser continuo con las trompas de Falopio y se extiende hasta el cuello. Hacia la luz del órgano, las fibras musculares se entrelazan con el revestimiento interno de la cavidad uterina (endometrio) y este sector se denomina interfase endometrio-miometrial, la cual está ricamente vascularizada.

En los animales con útero bicornal, el miometrio se organiza en dos capas, separadas por un plexo conjuntivo vascular muy desarrollado. En la capa más externa, las fibras musculares lisas se orientan longitudinalmente, siguiendo el eje mayor del cuerno uterino. En la capa más interna, éstas se orientan de forma circular y perpendicular al eje mayor del cuerno (Fig. 2).

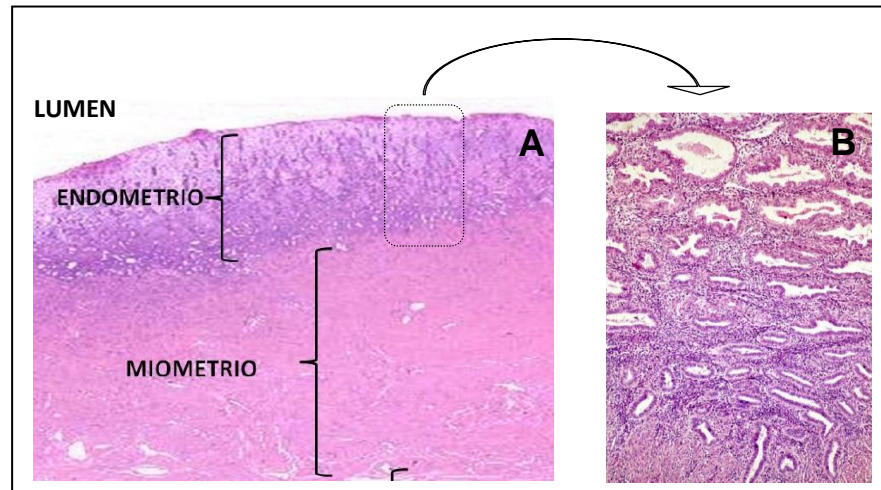


**Figura. 2** Muestra un corte trasversal del cuerno uterino de la rata teñido con hematoxilina y eosina. Se observa la organización del miometrio compuesto por una capa muscular longitudinal (CML) y una capa muscular circular (CMC). Entre ambas se distinguen vasos sanguíneos (vs) localizados en el plexo conjuntivo vascular que separa ambas capas miometriales. E. Endometrio.

En todas las especies, la cavidad uterina está tapizada por el endometrio, que consiste en una mucosa revestida por un epitelio cilíndrico simple (Weiss, 1986; Fawcett, 1992). Desde el epitelio se originan numerosas glándulas tubulares que se extienden hasta la base del estroma, el cual también presenta un rico plexo vascular (Fig. 3a).

En las mujeres en edad reproductiva se distinguen dos capas en el endometrio: la capa funcional y la capa basal. La capa funcional es la adyacente a la cavidad uterina y la

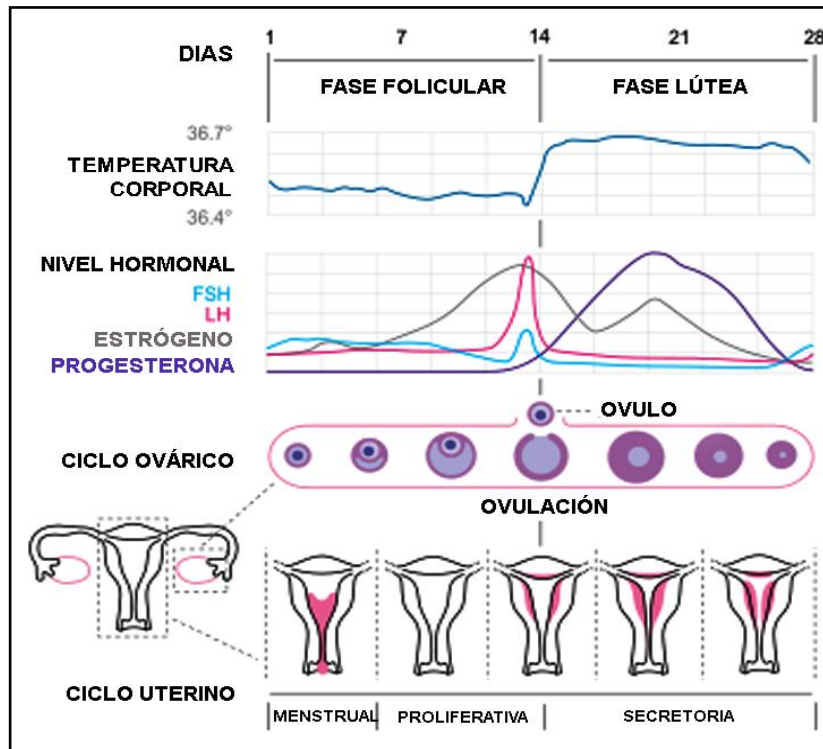
encargada de proveer un ambiente apropiado para la implantación y crecimiento del embrión. Esta capa se desprende durante la menstruación y durante la primera mitad del ciclo se reconstruye totalmente (Fig. 3b mitad superior). La capa basal es la adyacente al miometrio (Fig. 3b mitad inferior). Esta capa no se desprende en ninguna fase del ciclo y es a partir de ella que se desarrolla la capa funcional (Batista & col., 2006; Medina & Lebovic, 2009).



**Figura 3.** Histología de cortes transversales de útero. **A:** muestra las capas endometrial y miometrial que componen al útero. En la figura **B** se aprecian las dos regiones del endometrio: la capa funcional localizada en la porción superior de la figura y hacia la mitad inferior, la capa basal.

El endometrio experimenta cambios cíclicos en su estructura y actividad secretoria en respuesta directa a los niveles de esteroides ováricos. En los humanos y los grandes primates, este ciclo se denomina menstrual, mientras que en la mayoría de los otros mamíferos este ciclo se conoce como estral. En ambos casos, el endometrio prolifera bajo la influencia del estrógeno que ocurre en la primera mitad del ciclo (fase proliferativa). Cuando ocurre la ovulación, los cuerpos lúteos ováricos comienzan a producir progesterona, cambiando el patrón proliferativo del endometrio a uno secretorio (fase secretoria o lútea). De esta manera, el endometrio se convierte en un ambiente apropiado para recibir a los blastocitos. Si estos se implantan, el revestimiento endometrial no se desprende y persiste como decidua, la que posteriormente pasa a formar parte de la placenta. Si no ocurre la fecundación, los niveles de estrógeno y progesterona decrecen, la capa funcional del endometrio pierde el soporte trófico y sufre un proceso de regresión.

La falta de progesterona, provoca la vasoconstricción de las arterias endometriales. La isquemia resultante, produce la muerte celular y la menstruación (Fig. 4), (Groothuis & col.,2007; Maruyama & Yoshimura, 2008).



**Figura 4.** Ilustración del ciclo menstrual humano. En la mitad superior de la figura se observa la curva de variación de las hormonas hipofisarias y ováricas en cada etapa del ciclo. En el segmento inferior se representan los cambios morfológicos que experimentan el ovario y el endometrio uterino en respuesta a la variación hormonal. FSH: foliculo -estimulante. LH: luteinizante.

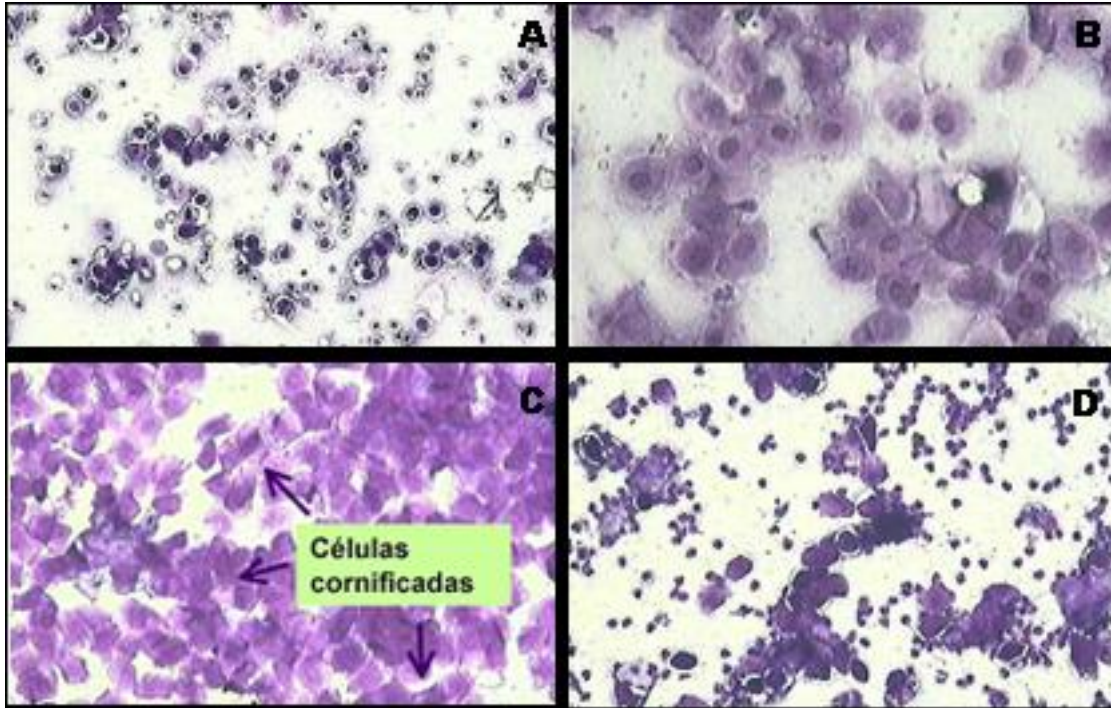
En los humanos, es posible determinar la fase del ciclo menstrual a partir de ciertos rasgos histológicos del endometrio, tales como su altura y características del epitelio (Tabla I).

La falta de hormonas provoca una actividad endometrial. Por ejemplo el endometrio de la mujer menopáusica se describe como atrófico, el cual también se observa tras el uso prolongado de anticonceptivos con altos niveles de progesterona. Contrariamente, la exposición crónica al estrógeno produce hiperplasia la cual a la larga, puede generar la malignización del endometrio.

<b>Fase del Ciclo</b>	<b>Día</b>	<b>Espesor del Endometrio</b>	<b>Características del Epitelio</b>
<b>Fase menstrual</b>	1-4	Delgado	Ausente
<b>Fase Proliferativa</b>	4-14	Intermedio	Cilíndrico
<b>Fase Secretoria</b>	15-28	Grueso	Cilíndrico Se visualizan ramas de las arterias espirales en el estroma.

**TABLA I:** Muestra algunas de las características del endometrio en distintas fases del ciclo menstrual humano.

En los humanos el ciclo dura un promedio de 28 días, mientras que en otras especies tiene una duración variable. Por ejemplo, en la rata, el ciclo estral dura entre 4 y 5 días; y está dividido en proestro, estro, metaestro y diestro. Las fases del ciclo estral son fácilmente reconocibles mediante el estudio de las células presentes en el exudado vaginal (Fig. 5), (Long & Evans, 1922).



**Figura 5.** Fotografías de las fases del ciclo estral en roedores. **A:** Durante el diestro los folículos ováricos comienzan su crecimiento promovidos por la FSH. En los frotis vaginales se observan abundantes leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas. **B:** En la fase de proestro los folículos ováricos se encuentran en pleno desarrollo y comienza la producción de estrógeno, lo cual promueve la proliferación y el consecuente engrosamiento del epitelio vaginal. En esta etapa las células que predominan en el exudado son las epiteliales. **C:** En el estro se produce el pico de LH y la consecuente ovulación múltiple. Las células presentes en esta etapa son las cornificadas. **D:** En la fase de metaestro aumenta la producción de progesterona y se observa la disminución del espesor del epitelio vaginal. Los leucocitos y pocas células cornificadas caracterizan esta fase del ciclo.

## 2. Endometriosis

La endometriosis es una enfermedad crónica y debilitante definida por la presencia de crecimientos vascularizados de tejido histológicamente similar al endometrio fuera de la cavidad uterina (Fig. 6). Es una patología dependiente del estrógeno que puede afectar a cualquier mujer, sin distinción de razas o etnias. Si bien estas formaciones están vascularizadas y sufren proliferación e invasión celular, la endometriosis es una patología benigna (Giudice & col., 1998).

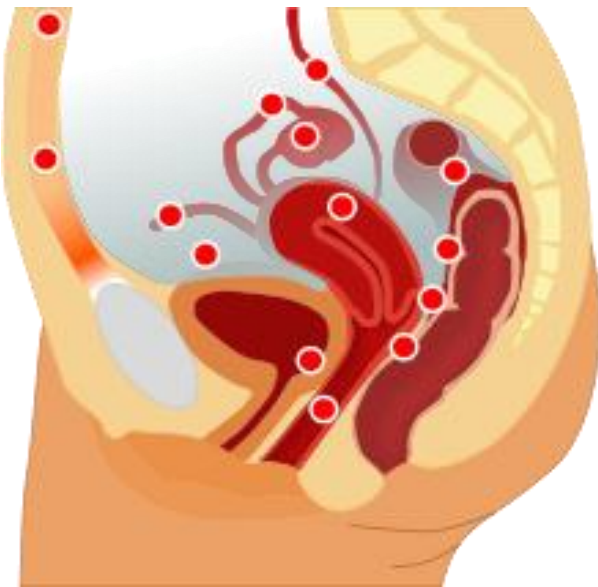


**Figura 6.** Imagen laparoscópica de dos lesiones endometrióticas peritoneales humanas (fechas).

La endometriosis afecta entre el 10 y 15% de las mujeres en edad reproductiva. Se presenta entre el 20 y 50% de las mujeres con infertilidad y alcanza hasta un 80% en las mujeres que padecen dolor pélvico crónico (Medina & Lebovic, 2009). La incidencia de esta enfermedad se ha visto incrementada en la población occidental por los cambios en la conducta reproductiva de las mujeres. Esto se debe a que tanto el retraso en la edad de la primera gestación, como el bajo número de embarazos y los largos períodos transcurridos entre gestaciones sucesivas promueven tiempos de exposición prolongados al estrógeno y un número mayor de menstruaciones, lo que favorece el desarrollo de la patología (Fraser, 2010).

Existen tres formas de endometriosis, la más común de ellas es la Endometriosis Peritoneal, donde los quistes endometrióticos crecen sobre la capa serosa que recubre los órganos, siendo los sitios más comunes de implantación el útero, vejiga, intestino y uréteres (Fig. 7). Dependiendo de la localización de los focos endometrióticos estos provocan dolor al orinar (disuria), dolor durante la defecación (disquemia) e incluso forman adhesiones que conllevan al desarrollo de fuertes dolores pélvicos crónicos. Otra forma en la que se manifiesta la enfermedad se conoce como Endometriosis Ovárica, donde los fragmentos de endometrio se adhieren a la superficie del ovario y posteriormente se invaginan en la corteza del órgano dando lugar a masas quísticas llamadas endometriomata. Este tipo de lesiones además de causar fuertes dolores menstruales (dismenorrea) pueden destruir el epitelio germinal y disminuir el número de ovocitos disponibles. Dada la proximidad anatómica de las trompas de Falopio y los ovarios, los

endometriomata pueden producir adhesiones que resulten en la oclusión de las trompas, estos factores pueden provocar infertilidad en las pacientes. La tercera forma de la enfermedad es la Endometriosis Profunda, la cual se caracteriza por la formación de nódulos que contienen tejido fibromuscular y tejido endometrial. Estas lesiones se encuentran principalmente en el ligamento útero-sacro, en el tabique recto-vaginal e incluso en el miometrio del propio útero. Este tipo de endometriosis está asociada con disquemia, dolor durante el coito (dispareunia) y consecutivos episodios de diarrea durante varios meses (Nisolle & Dannez, 1997; Anaf & col., 2000 a; Hsu & col., 2011).



**Figura 7.** Esquema donde se señalan los sitios más comunes de implantación de las lesiones endometrióticas humanas.

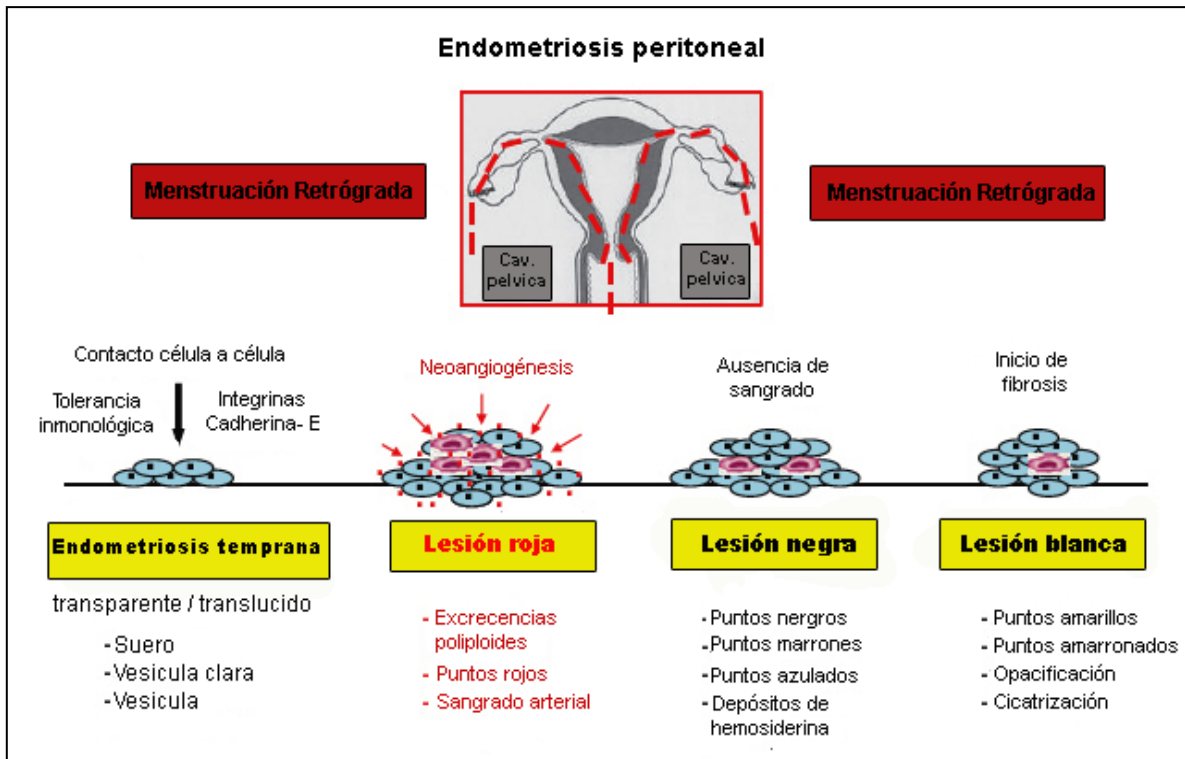
No existe cura para la endometriosis, sólo existen tratamientos para manejar el dolor y evitar la dispersión de la enfermedad. En ciertas mujeres la menopausia natural, química o quirúrgica mejoran los síntomas. El tratamiento farmacológico más común es la utilización de los llamados agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa) (Fedele & col., 1988). Estas sustancias interactúan con los receptores de GnRH y suprimen la secreción hipofisaria de gonadotropinas, conduciendo a un estado hipoestrogénico. También el uso de progestinas, anticonceptivos orales e inhibidores de aromatasas son estrategias usadas para tratar la endometriosis, pero todas ellas conllevan efectos secundarios indeseables, incluyendo infertilidad (Nothnick, 2010). Por

esta razón en las mujeres jóvenes que desean ser madres, el tratamiento de elección es la cirugía para remover los quistes endometrióticos, seguida de tratamientos para reestablecer la fertilidad.

### **3. Etiología de la endometriosis**

Se han propuesto al menos tres teorías que intentan explicar las causas de la ENDO. La teoría de la Metaplasia Celómica propone que el mesotelio peritoneal, en respuesta a procesos inflamatorios e influencias hormonales, sufre una transformación hacia estroma y glándulas de tipo endometrial ([Anaf & col., 2000 b](#); [Itoga & col., 2003](#); [Odagiri & col., 2009](#)). Otra teoría señala que restos celulares embrionarios, como el conducto Müllero, sufran un proceso de diferenciación celular hacia células endometriales. La teoría más aceptada para explicar cómo se desencadena la patología es el fenómeno de menstruación retrógrada propuesto por Sampson en 1927. Según esta teoría, parte del flujo menstrual portador de células endometriales que se descaman con cada menstruación, viajaría retrógradamente y se escaparía hacia la cavidad peritoneal a través de las trompas de Falopio. Los fragmentos de endometrio que llegan al peritoneo, se adherirían a la superficie peritoneal donde proliferan y crecen formando lesiones endometrióticas ectópicas ( Fig. 8). Aunque ninguna de estas teorías por si sola puede explicar los distintos tipos de endometriosis, diversos estudios epidemiológicos apoyan ampliamente la hipótesis de Sampson ([Viganò & col., 2004](#)).





**Figura 8.** Representación esquemática del establecimiento y evolución de las lesiones endometrióticas en la cavidad pélvica. Inicialmente las células endometriales escapan de la vigilancia inmune y se adhieren a la pared peritoneal, desarrollando así una lesión temprana. Los factores mitogénicos y angiogénicos promueven el crecimiento y vascularización de las mismas. Durante este proceso es posible observar sangrado en las lesiones, lo cual les confiere una apariencia rojiza. Finalmente cesa el sangrado y las lesiones endometrióticas cambian su aspecto volviéndose más oscuras e inician un proceso de transformación hacia tejido fibroso. Modificado de Khan & col., 2008.

Cabe señalar, sin embargo, que la menstruación retrógrada es un evento común en el 90% de las mujeres. Es por lo tanto factible que existan otros factores que contribuyan al desarrollo de la enfermedad (Halme & col., 1984). A lo largo de cada ciclo sexual el endometrio uterino sufre ciclos de proliferación, secreción, regresión y regeneración. Esta serie de eventos complejos pueden cambiar la estructura, los componentes inmunes y las moléculas de adhesión presentes en el endometrio eutópico (intrauterino). Es posible que estas nuevas propiedades del tejido endometrial le confieran mayor capacidad proliferativa, permitiéndole implantarse y crecer (Healy & col., 1998; Sharpe-Timms, 2001).

Durante la fase menstrual del ciclo sexual, se produce naturalmente un aumento del número de células inflamatorias, particularmente macrófagos y *natural killers*, que ayudan a limpiar los restos de endometrio que se descaman. Contrariamente, en las mujeres que padecen la enfermedad, las células inmunológicas no logran eliminar completamente los restos de endometrio. Además, la ausencia de una adecuada respuesta inflamatoria impide que el endometrio sea reconocido como un tejido foráneo, permitiéndole formar lesiones endometrióticas ectópicas (Vinatier & col., 1996; Berbic & Fraser, 2011). En este sentido cabe señalar que muchas pacientes con ENDO también presentan desórdenes autoinmunes, asma y alergias; lo que apoya la hipótesis de que el desarrollo de la endometriosis se asociaría con defectos en la respuesta inmune de las pacientes.

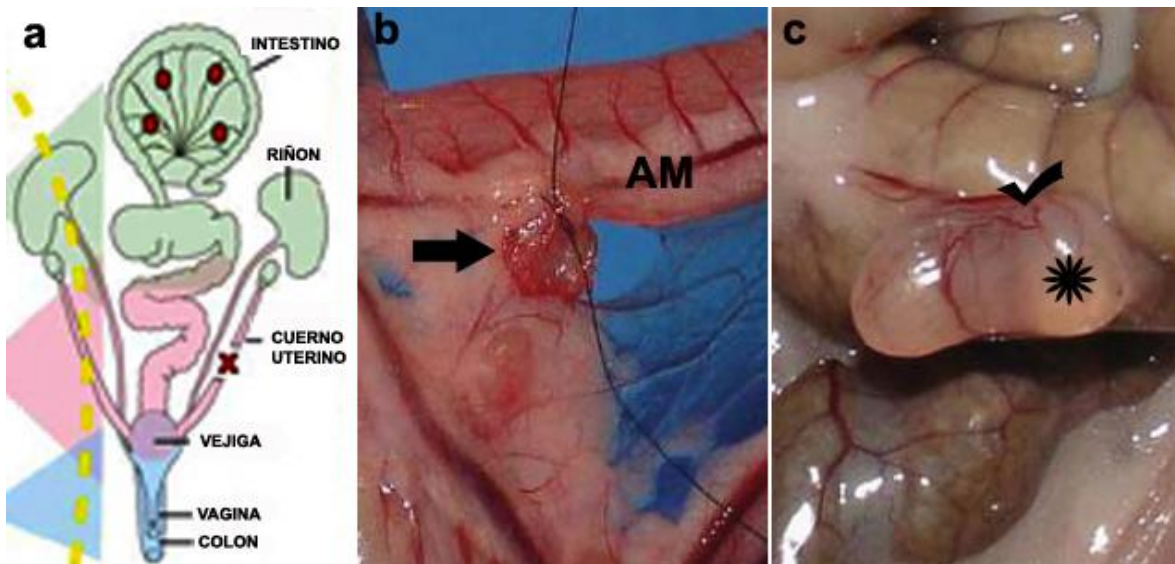
#### **4. Modelos experimentales para el estudio de la endometriosis**

La presentación clínica de la endometriosis es muy variable, lo cual ha generado grandes dificultades para el correcto diagnóstico y el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad (Farquhar, 2007). A consecuencia de esto, los tratamientos utilizados actualmente se enfocan en tratar los síntomas de la enfermedad en lugar de enfocarse en las causas que los provocan. Esto conlleva a que el 75% de las mujeres quirúrgicamente tratadas vuelvan a desarrollar quistes endometrióticos (Giudice & Kao, 2004; Asante & col., 2011).

Dado que esta patología solamente ocurre espontáneamente en humanos y en algunos primates no-humanos, se han desarrollado modelos animales para el estudio de los mecanismos que subyacen a la enfermedad (Grümmer, 2006). En ciertos primates como los monos Babuinos y *Macaca Mulatta*, la enfermedad se desarrolla naturalmente pero no se presenta con gran frecuencia. Por esta razón, se han generado modelos experimentales donde se liga el cuello uterino, permitiendo de esta forma aumentar el reflujo menstrual hacia la cavidad peritoneal y facilitando el establecimiento de la enfermedad. Dada la gran similitud anatómica, endocrina y fisiológica entre los monos y humanos, estos modelos ofrecen información preclínica para probar nuevas drogas ya sea para la prevención o el tratamiento de la ENDO (Fazleabas & col., 2002; Tirado-González & col., 2010).

Los modelos más utilizados son sin embargo, los realizados en roedores, donde se induce el desarrollo de la enfermedad mediante el trasplante de tejido endometrial a la cavidad

peritoneal. Estos modelos se clasifican en homólogos y heterólogos. En el modelo homólogo, se auto-transplantan fragmentos de endometrio o la totalidad de la pared uterina a la cavidad peritoneal del mismo animal, siendo los sitios de trasplante más frecuentemente usados, la pared abdominal y el mesenterio intestinal, (Figs. 9 a,b) (Berkley & col., 2004; Do Amaral & col., 2009).

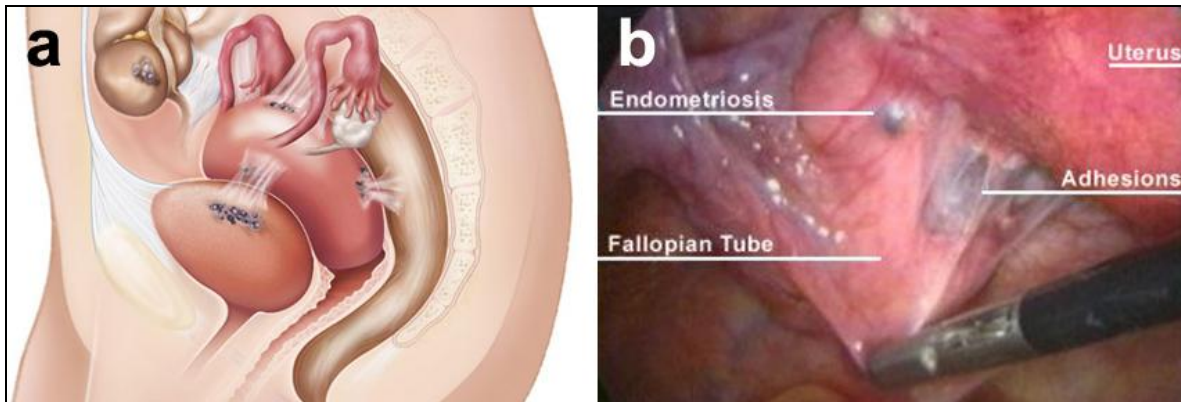


**Figura 9.** Modelo de endometriosis experimental en rata. La figura **a** muestra un esquema general del método de autotransplante. En la figura **b**, se muestra un fragmento de la pared uterina (flecha) que es suturada sobre una arteria mesentérica (AM). Luego de tres semanas (**c**), se ha formado un quiste endometriótico (asterisco) el cual está ricamente vascularizado (V). (a) Modificado de Berkley y col., 2005; (b, c) Tomado de Nogueira Neto y col., 2007.

El modelo heterólogo, consiste en el trasplante de fragmentos de tejido entre animales de diferentes especies, estando el receptor farmacológica o genéticamente inmunodeprimido (Hirata & col., 2005). La ventaja de este último método es que permite transplantar endometrio humano a la cavidad peritoneal de roedores y de esta manera aproximarse mejor a la enfermedad real, permitiendo evidenciar mecanismos de establecimiento de la patología y estudiar posibles estrategias terapéuticas.

## 5. El dolor de la endometriosis – Papel de la innervación

No se sabe con certeza que tipo de estímulo inicia los severos dolores que experimentan las pacientes con endometriosis. Se piensa que uno de los factores que contribuyen al dolor son las numerosas adherencias que se forman en torno a las lesiones endometrióticas (Figs. 10 a,b).



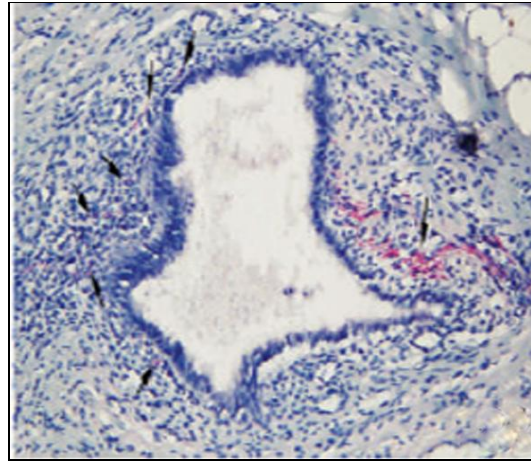
**Figura 10. (a)** Muestra la localización de las adherencias que se forman entre los endometriomas y distintas vísceras de la cavidad abdominal. **(b)** Ilustra detalles de las adherencias entre los focos endometrióticos, el útero y la trompa de Falopio.

Por otra parte y considerando que la endometriosis es una enfermedad inflamatoria, se ha planteado que los mediadores inflamatorios liberados por el foco ectópico y los tejidos que lo rodean podrían sensibilizar o activar a las terminales nerviosas sensoriales del peritoneo adyacente, interactuando con los nociceptores presentes en su superficie e iniciando así la sensación de dolor.

Aunque parezca llamativo, la participación directa del sistema nervioso en la sintomatología de la endometriosis no fue tomada en cuenta hasta hace poco tiempo. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las tres formas de lesiones endometrióticas humanas están ricamente innervadas (Medina & Lebovic, 2009; Fraser, 2010).

En el 2006, Tokushige y colaboradores, demostraron la presencia de fibras nerviosas amielínicas y mielínicas en los focos endometrióticos peritoneales, observando también

que la densidad de inervación de estas lesiones era muy superior a la del peritoneo normal (Fig. 11), (Tokushige & col, 2006).

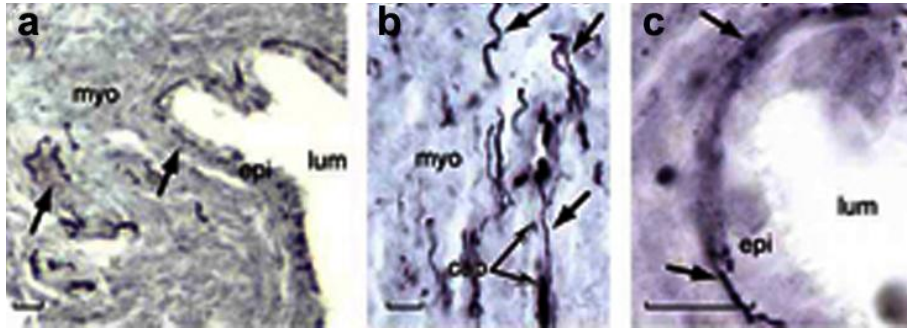


**Figura 11.** Muestra la presencia de fibras nerviosas (flechas) en una lesión endometriótica peritoneal, demostradas mediante el empleo del marcador neural general PGP 9.5 (del inglés: protein gene product 9.5) y reveladas con cromógeno rojo (permanent fase red chromogen). Tomado de Tokushige y col., 2006.

Las fibras mielínicas fueron identificadas como fibras A $\delta$ , las cuales son capaces de transmitir dolor agudo y localizado al sistema nervioso central. Se observó que en la mayoría de los casos, estas fibras no penetraban profundamente en las lesiones endometrióticas, quedando generalmente alejadas de sus componentes glandulares. Estudios posteriores mostraron que la distancia entre las fibras mielínicas y las glándulas endometrióticas es menor en las mujeres que presentan dolor intenso que en las que presentan dolor moderado o no padecen dolor (Tulandi & col., 2001).

Las fibras nerviosas amielínicas presentes en los focos endometrióticos fueron identificadas como sensoriales de tipo C, simpáticas y parasimpáticas (Tokushige & col., 2007). Estas fibras penetran profundamente dentro de las lesiones y se asocian con las glándulas presentes en este tejido. Se observó también que las mujeres que reportaban dolores más severos eran las que presentaban focos endometrióticos que infiltraban cinco o más centímetros el espacio retroperitoneal o la pared del órgano pélvico afectado. En la endometriosis infiltrante profunda, la densidad de nervios es más rica que en las formas de endometriosis más superficiales (Wang & col., 2009).

La presencia de invasión por estos distintos tipos de fibras nerviosas también ocurre en los modelos animales de endometriosis experimental provocada por el autotransplante de fragmentos de útero a la cavidad peritoneal (Fig. 12), (Berkley & col., 2004, 2005; Zhang & col., 2008).



**Figura 12.** Ilustra la invasión de los quistes endometrióticos peritoneales, provocados por el autotransplante de fragmentos de la pared uterina. **a** Inervación total, revelada por el marcador general PGP 9.5; **b** inervación simpática; **c** inervación sensorial. Tomado de Berkley y col., 2005

Se ha determinado que en los modelos de endometriosis experimental, la elevación en los niveles de estrógeno se acompaña de un aumento en la densidad de fibras nerviosas simpáticas, mientras que la invasión sensorial no se ve afectada (Zhang & col., 2008; Tokishige & col., 2010). En este marco se postula, que las fibras nerviosas simpáticas contribuirían a la sintomatología de la enfermedad, ya sea activando y/o sensibilizando las terminales sensoriales. Más aún, se plantea que su aumento en respuesta al estrógeno, sería responsable de la potenciación de los síntomas durante el periodo peri-menstrual. También, se ha observado que la invasión simpática jugaría un papel importante en la aceptación del trasplante (Ruocco & col., 2000; Ferretti & col., 2003). Por esta razón, es posible que la invasión simpática de las lesiones endometrióticas no sólo participe en su sintomatología, sino que también contribuya al crecimiento y mantenimiento de las lesiones (Berkley & col., 2004).

## 6. Posible contribución del ambiente peritoneal a la reinervación simpática de los focos endometrióticos.

Los factores que promueven la reinervación de los focos endometrióticos humanos y experimentales no se conocen en profundidad. Se sabe que la presencia de tejido endometrial en el peritoneo desencadena una respuesta inflamatoria estéril, la cual lleva al reclutamiento de un gran número de células inflamatorias, tales como macrófagos (M $\Phi$ ), *natural killers* y eosinófilos. Estas células se encuentran presentes en números reducidos o están ausentes en el peritoneo de las mujeres sanas (Oral & col., 1996; Koninckx & col., 1998).

Los M $\Phi$  son la célula inmune más abundante en los crecimientos endometrióticos y en el peritoneo de las pacientes afectadas por la endometriosis. Los M $\Phi$  reclutados por los endometriomas, no cumplen con su característico papel de “removedores” de restos celulares y no atacan al tejido foráneo. Contrariamente, hoy se cree que los productos liberados por los M $\Phi$  tendrían un papel en la iniciación, el mantenimiento y la progresión de la endometriosis (Gazvani & Templeton, 2002; Khan & col., 2004). Por esta razón, se piensa que la endometriosis es una enfermedad inflamatoria crónica, con alteración en la inmunidad celular y humoral (Oosterlynck & col., 1991).

Interesante desde la óptica del presente estudio, es la observación de la existencia de una estrecha correlación entre el número de M $\Phi$  presentes en los endometriomas y su densidad de inervación (Tran & col., 2009). Los M $\Phi$  activados liberan una variedad de productos, entre los que se cuenta una amplia gama de citoquinas y factores tróficos (Gazvani & Templeton, 2002). Por ejemplo, los M $\Phi$  producen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) el cual no sólo regula la angiogénesis, sino que tiene efectos neurotróficos que podrían contribuir a la inervación de las lesiones endometrióticas (Fraser, 2010; Khan & col., 2010).

Los M $\Phi$  producen el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*) el cual promueve el crecimiento de los nervios simpáticos y sensoriales aferentes primarios derivados de la cresta neural (Brebic & Fraser, 2011). Se ha observado que los tratamientos que generan estados hipoestrógenicos reducen los niveles de NGF en los endometriomas, conjuntamente con su inervación simpática y sensorial (Tokushige & col, 2008 a,b). Un estudio reciente ha mostrado la existencia de una sobre-expresión de NGF

en el fluido peritoneal de las pacientes afectadas por la endometriosis, el cual contribuiría a promover el crecimiento neurítico hacia los sitios de lesión ([Barcena de Arellano & col., 2011](#)). En línea con estos conceptos, se ha reportado que en las regiones del corazón afectadas por un infarto experimental, se observa un aumento en la densidad de nervios simpáticos y también en el número de MΦ ([Hasan & col., 2006](#)). Más aun, cuando se trata a los animales con drogas que reducen el número de MΦ (clodronato transportado en liposomas), no se detecta el señalado aumento en la densidad de nervios simpáticos ([Wernli & col., 2009](#)).

El NGF podría también participar en la génesis del dolor causado por estas lesiones, ya que estimula la síntesis de la sustancia P y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), ambos neurotransmisores utilizados por los nervios sensoriales aferentes primarios en la transmisión de estímulos dolorosos ([McLean & col., 1989](#); [Shu & col., 1999](#); [Anaf & col., 2002](#)). Recientemente, se investigó el papel del NGF en el desarrollo del dolor pélvico y menstrual que presentan las pacientes con ENDO. Para ello, se analizó la concentración de NGF en el fluido peritoneal de pacientes con ENDO que reportaban distintos grados de dolor (categorizados de 1 a 7). En los 7 grupos estudiados, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de NGF. Más aun, en ensayos *in vitro*, en los que se cultivaron explantos de ganglio de la raíz dorsal de pollo en un medio suplementado con fluido peritoneal de estas pacientes, se observó que dicho fluido promovía el crecimiento neurítico sensorial, pero no se detectaron diferencias en el grado de crecimiento entre los distintos grupos de pacientes. Estos resultados fueron interpretados como indicadores de que el NGF tiene un efecto neurotrófico, pero no se vincula con la magnitud del dolor causado por la ENDO ([de Arellano & col., 2011](#)).

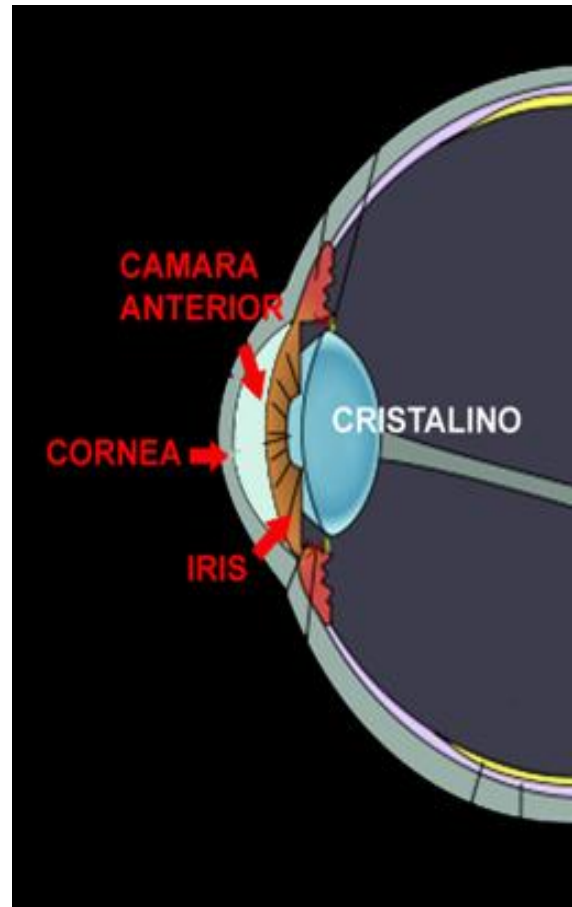
Sin bien estos resultados sugieren que el ambiente peritoneal y el proceso inflamatorio iniciado por la presencia de los endometriomas podrían contribuir en la reinervación de las lesiones, no se conoce aún cual es su relevancia.

Con el fin de evaluar la capacidad de reinervación simpática del tejido endometrial fuera de la influencia del ambiente peritoneal, transplantaremos fragmentos de endometrio a la cámara anterior del ojo (CAO). La CAO fue elegida por ser un sitio inmunológicamente privilegiado, el cual hasta el presente nunca ha sido utilizado como lugar de transplante para los estudios de endometriosis experimental.



## 7. La cámara anterior del ojo

La cámara anterior del ojo (CAO, Fig. 13), al igual que los órganos reproductores y el cerebro, son sitios inmunológicamente privilegiados, y a diferencia del peritoneo, carecen de repuesta inmune innata y adaptativa. Así, los tejidos foráneos transplantados a los sitios inmunológicamente privilegiados no son rechazados, lo que permite su sobrevivencia por períodos prolongados (Streilein, 2003 a,b). Este fenómeno, lejos de ser un mecanismo pasivo, está rigurosamente controlado por complejos mecanismos celulares y moleculares (Hori & col., 2010). La base de acción de este fenómeno es desviar la respuesta inmune generada contra la presencia del antígeno intraocular, lo cual genera una tolerancia al mismo. Este mecanismo se conoce como “desviación inmune de la cámara anterior del ojo” (ACAID, del inglés *anterior chamber-associated immune deviation*) (Hori, 2008, Taylor, 2009).



El método de trasplante a la CAO ha sido ampliamente utilizado para estudiar aspectos de la fisiología de distintos tejidos en un ambiente distinto a su medio natural. Los tejidos transplantados a la CAO son revascularizados, lo que permite estudiar el efecto sistémico de distintos agentes (ej., hormonas) y también fármacos. También es posible inyectar estas sustancias directamente en la CAO y valorar su efecto local. Recientemente, la CAO está siendo estudiada como sitio terapéutico alternativo para el trasplante de tejido pancreático y regular los niveles sistémicos de glucosa en la diabetes mellitus tipo I (Cantarelli & Piemonti, 2011; Leibiger & col., 2011).

No menos importante es el hecho de que los tejidos transplantados a la CAO son reinervados por los nervios del iris, pero lo hacen con un patrón organotípico, es decir remedando la inervación normal de los mismos. Por esta razón, este modelo ha sido muy

utilizado para valorar la influencia del tejido efector sobre las características de su inervación, incluyendo la del miometrio uterino (Brauer & col., 1998, 2000, 2002).

### **OBJETIVO GENERAL**

Valorar el método de trasplante a la cámara anterior del ojo como un modelo alternativo para el estudio experimental de la endometriosis.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (a) Evaluar las características morfológicas e histológicas del tejido endometrial transplantado a la cámara anterior del ojo.
- (b) Analizar la capacidad de reinervación simpática del endometrio en la cámara anterior del ojo.

### **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

Con el fin de alcanzar los objetivos planteados, transplantamos fragmentos de endometrio a la CAO de ratas adultas cíclicas, donde permanecieron por períodos de una, dos, tres y seis semanas. Las hembras hospederas se sacrificaron en proestro, dado que esta es la fase del ciclo estral donde se detectan los niveles mayores de estrógeno en la circulación sanguínea, y es bajo la dominancia de esta hormona cuando ocurre la exacerbación de los síntomas que caracterizan a la endometriosis.

Para cumplir con el primer objetivo, se evaluó la histología de los trasplantes, determinando la presencia de estroma, glándulas y la eventual formación de quistes.

Para cumplir con el segundo objetivo, se analizó la inervación simpática de los trasplantes utilizando ensayos de inmuno-histoquímica y se correlacionó la inervación con estructuras histológicas específicas presentes en el tejido. Finalmente, utilizando métodos computarizados de cuantificación de fibras nerviosas, se evaluó la densidad de inervación de los trasplantes endometriales y se comparó con la del endometrio eutópico en proestro y diestro.

MATERIALES Y METODOS

## **1. Animales**

Para el presente estudio se utilizaron ratas hembras cíclicas de 2 a 3 meses de edad de la cepa Wistar de la colonia del IIBCE. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones constantes de iluminación y temperatura, con libre acceso a agua y alimentos. Los protocolos experimentales han sido aprobados por la Comisión de Bioética del IIBCE (Expediente 010/09/2010).

## **2. Transplante de endometrio a la cámara anterior del ojo**

### **2.1 Preparación de los transplantes**

Los tejidos a ser transplantados se obtuvieron de ratas adultas (2-3 meses) las cuales fueron sacrificadas en fase de diestro del ciclo sexual mediante la administración de una sobredosis (60mg/kg) de pentobarbital sódico intraperitoneal (i.p.). Se removieron los cuernos uterinos y se colocaron en suero fisiológico estéril. Bajo un microscopio de disección, el cuerno uterino se abrió longitudinalmente y se extendió con la ayuda de microagujas sobre una lámina de *Silgard*. Posteriormente se procedió a separar el endometrio de la capa miometrial. El tejido endometrial se cortó en pequeños fragmentos de 1 x 1.5 mm, los cuales permanecieron en medio de cultivo refrigerado (DMEM/ F12/ HAM, Sigma-Aldrich, EEUU) hasta el momento de la cirugía.

### **2.2 Transplante de los tejidos a la cámara anterior del ojo**

Las ratas se anestesiaron con 90 mg/kg de ketamina (Phs Pharmaservice, Uruguay) y 10 mg/kg de xilazina (Vetcross, Uruguay). Antes de proceder a realizar la cirugía, se aplicó en los ojos una gota de atropina (10mg/ml, Sigma, EEUU) para producir mayor dilatación de la pupila, y una gota de anestésico local (Anestalcón, Alcon Ltda., Brasil). Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en la córnea, a través de la cual se introdujo el fragmento de endometrio previamente preparado. Esta cirugía no necesita de sutura y la visión de los animales no se ve alterada por la presencia del explanto.

Los transplantes de endometrio permanecieron en la cámara anterior del ojo por períodos de una, dos, tres y seis semanas. Luego de sacrificar a las ratas, los transplantes se extrajeron del ojo y se fijaron por inmersión durante 1 hora en paraformaldehído (PFA, Sigma, EEUU) al 4% en PBS (*phosphate buffer saline*) y luego de ser lavados en PBS, se crioprotegieron en sacarosa al 12% en PBS durante 12-24h

para evitar la formación de cristales intracelulares que pudieran dañar el tejido. Los tejidos se embebieron en un medio apropiado para su congelación (Shandon, EEUU) y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los trasplantes pertenecientes a un mismo grupo experimental ( $n=12-14$  trasplantes) se agruparon en un mismo bloque, se cortaron completamente en forma seriada ( $12\ \mu\text{m}$ ) utilizando un crióstato Leika (Alemania) y se montaron sobre portaobjetos gelatinizados.

### **3 Preparación de los úteros para inmunohistoquímica e histología**

Para determinar la fase del ciclo estral, las hembras fueron cicladas mediante frotis vaginales durante la semana previa a la realización de los ensayos y sacrificadas en proestro mediante una sobredosis de pentobarbital sódico i.p. Las ratas fueron perfundidas por vía transcavicular con 100 ml de solución salina (NaCl 0,9%), seguidos de 75 ml de paraformaldehído al 4% en PBS. Se extrajo el útero, y bajo lupa, se removió el tejido conjuntivo y grasa anexa; y se cortó la región cefálica del útero en fragmentos de aproximadamente 2mm de longitud. Estos fragmentos se fijaron por inmersión en PFA al 4% durante una hora adicional. Al finalizar la fijación, se realizaron 3 lavados de 15 minutos en PBS y el tejido se crioprotegió en sacarosa al 12%. Finalmente se realizaron cortes a congelación de  $12\ \mu\text{m}$  de espesor y transversales al eje mayor del cuerno.

### **4 Demostración de la inervación simpática**

Para la demostración de los nervios simpáticos se realizaron ensayos de inmunohistoquímica. Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente al antígeno correspondiente, permitiendo localizar moléculas de interés. En nuestros estudios utilizamos el método de inmunohistoquímica indirecta, donde se utiliza un anticuerpo primario que reconoce el antígeno de interés y un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo que reconoce una región específica del anticuerpo primario.

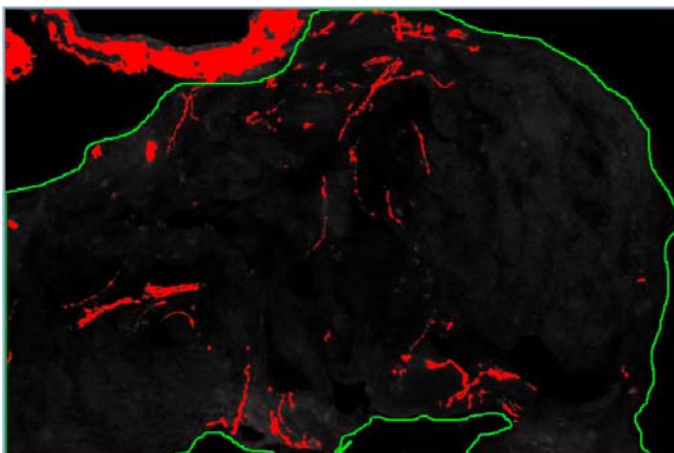
Para evidenciar los nervios simpáticos en los trasplantes intraoculares y los del útero, se utilizó un anticuerpo policlonal generado en conejo contra la tirosina hidroxilasa (anti-TH, Pierce Biotechnology, EEUU), enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de noradrenalina. Este anticuerpo se utilizó a una concentración de 1:400 diluido en una solución que contenía Triton X-100, Azida de sodio, DL-Lisina y suero normal de cabra. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente y en una

cámara húmeda. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 15 minutos en PBS a temperatura ambiente y con agitación constante. En una segunda etapa, los cortes de tejido se incubaron durante 1.30 h. con un anticuerpo secundario generado en cabra marcado con isotiocianato de fluoresceína (FICT, Chemicon, EEUU), diluído 1:400. Posteriormente los cortes fueron lavados en PBS bajo el mismo protocolo antes mencionado y finalmente montados en Citifluor (Londres, Reino Unido). La especificidad de el anticuerpo secundario fue controlada en cortes en los que se omitió el anticuerpo primario, procesados en idénticas condiciones. La especificidad del anticuerpo contra TH ha sido bien caracterizada en estudios previos del laboratorio.

## 5 Evaluación cuantitativa de la inervación simpática

Los preparados fueron examinados bajo un microscopio Nikon E800 equipado con epifluorescencia y usando el filtro B-2E con un rango de longitud de onda de excitación que abarca de 450 a 490 nm y un filtro de barrera de emisión de 520-560 nm (EX 450-490nm; B 520-560nm). Las imágenes microscópicas fueron capturadas utilizando una cámara digital refrigerada CoolSnap asociada al programa ImagePro Plus de Media Cybernetics (EEUU).

**5.1 Transplantes.** Usando un lente objetivo 20X se tomaron imágenes de todos los cortes obtenidos de cada trasplante individual. Con la ayuda del programa ImagePro Plus se delimito y midió el área parcial del trasplante fotografiada (Figura 14, delimitada en verde); luego se macró manualmente las fibras nerviosas simpáticas y se midió el área ocupada por los nervios simpáticos (Fig. 14, marcada en rojo); finalmente, con estos dos parámetros se calculó el porcentaje de área nerviosa para cada imagen (Cuadro 1).



**Fig. 14.** Esquema representativo del método utilizado para cuantificar el área ocupada por fibras nerviosas simpáticas.

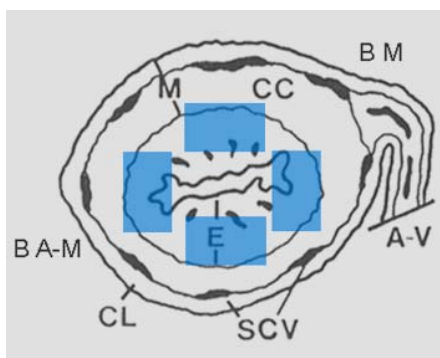
Estos valores fueron promediados para calcular el porcentaje de área ocupada por los nervios simpáticos y el área nerviosa total de cada trasplante (Cuadro 1).

Porcentaje de área ocupada por nervios	Área nerviosa total
$\frac{\text{Área ocupada por nervios} \times 100}{\text{Área parcial del trasplante}}$	$\frac{\% \text{ de área nerviosa} \times \text{área total del trasplante}}{100}$
Área parcial del trasplante	100

**Cuadro 1.** Cálculo del porcentaje de área ocupada por nervios y área nerviosa total.

Los valores obtenidos de cada trasplante fueron promediados y utilizados en los estudios estadísticos.

**5.2 Cuerno uterino.** En cada corte de cuerno uterino, se tomaron imágenes (20X) de cuatro regiones endometriales, incluyendo: el borde mesometrial, el borde anti-mesometrial y dos regiones laterales (Fig. 15). En cada una de estas regiones, fueron delineados manualmente los límites del endometrio con la ayuda del *mouse*, y se midió el porcentaje de área ocupada por fibras nerviosas. Luego se calculó el área nerviosa total (Bianchimano & col., 2007). Los valores obtenidos de los cortes de un mismo cuerno se promediaron para utilizarlos en los estudios estadísticos.



**Figura 15.** Esquema de un corte transversal de cuerno uterino mostrando en celeste las regiones del endometrio que fueron capturadas y posteriormente utilizadas para realizar el análisis de densidad de fibras nerviosas simpáticas. B M: borde mesometria; B A-M: borde anti-mesometrial; M: miometrio; E: endometrio; CL: capa miometrial longitudinal; CC: capa miometrial circular; SCV: septo conjuntivo vascular.

Finalmente, con el fin de evaluar la histología de los trasplantes y correlacionar la distribución de los nervios con estructuras del tejido, luego de finalizar la captura de

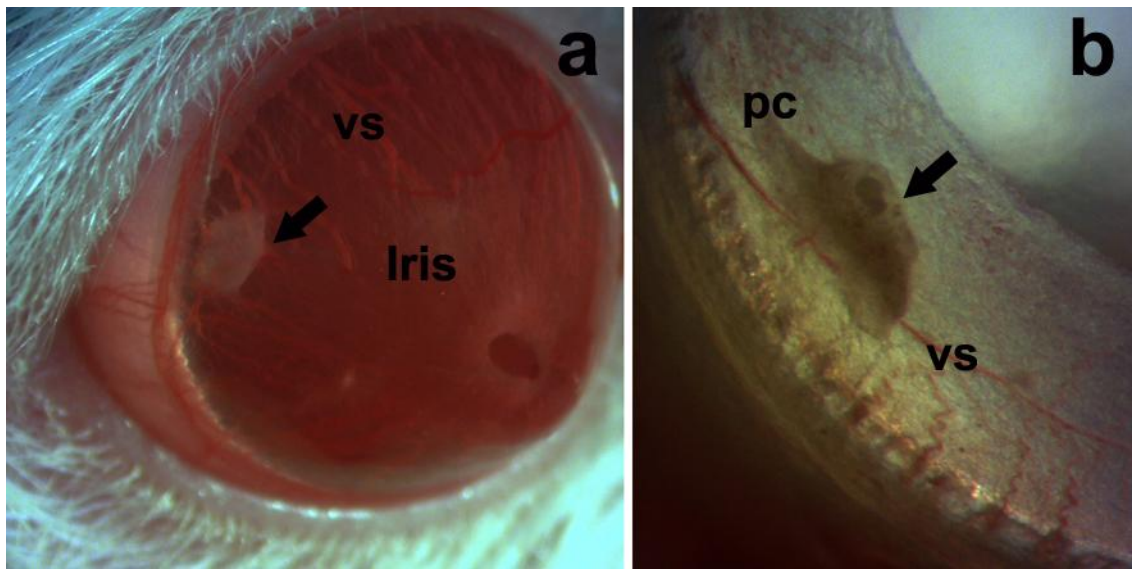
**Estadística.** Los datos obtenidos de los estudios de cuantificación de fibras nerviosas fueron comparados utilizando tests no-paramétricos. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.



RESULTADOS

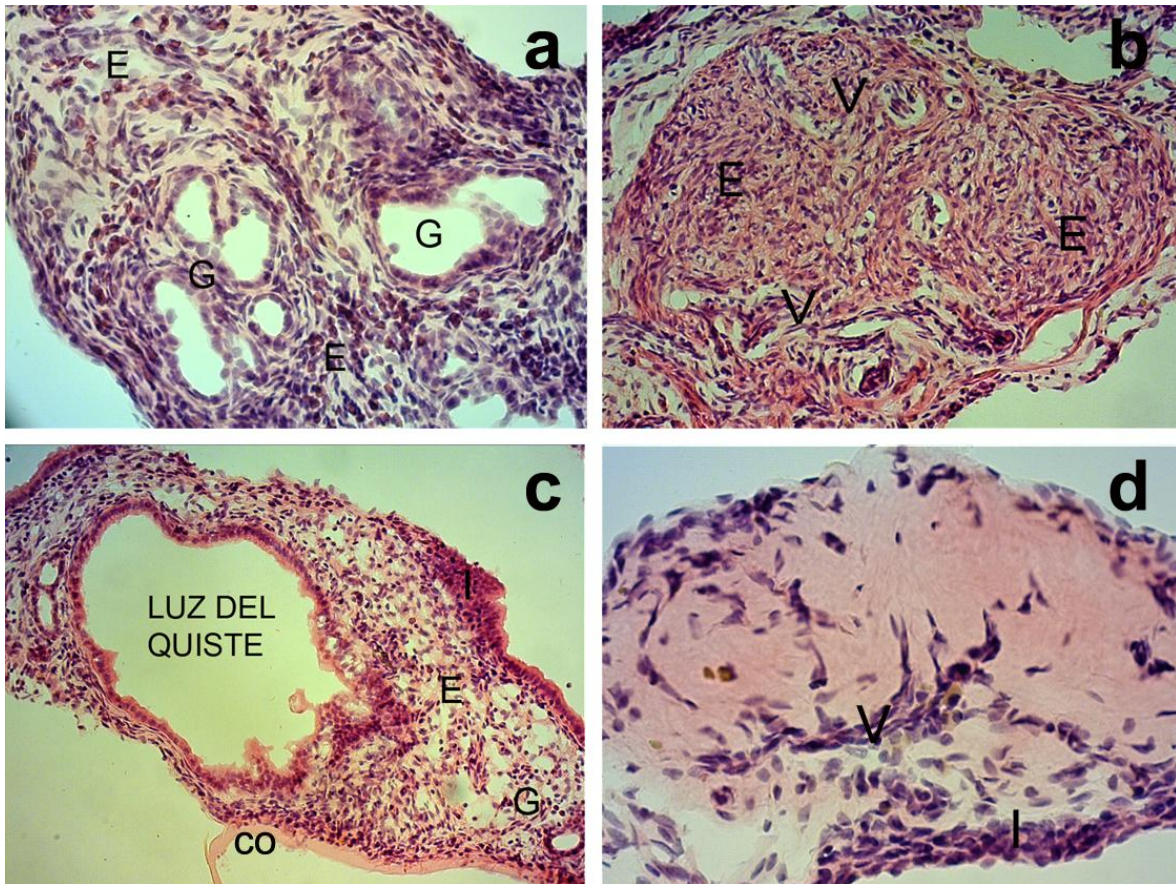
## 1. Evolución de los trasplantes en la cámara anterior del ojo

Luego de una semana de ser transplantados a la CAO, los explantos endometriales establecieron contacto anatómico con el iris de las hospederas a través de la formación de puentes conjuntivos. Posteriormente, se observó que los trasplantes eran revascularizados por los vasos sanguíneos del iris (Fig. 16 a, b).



**Figura 16.** Se ilustran imágenes estereoscópicas de trasplantes de endometrio que han permanecido en la cámara anterior del ojo por 3 semanas. **a:** imagen panorámica donde se reconoce el iris y sus numerosos vasos sanguíneos (vs). Señalado con una flecha se observa el trasplante endometrial; **b:** muestra a más aumento otro trasplante endometrial (flecha) y los vasos sanguíneos (vs) que lo revascularizan. Nótese el puente conectivo (pc) que une el trasplante al iris.

El examen histológico de los trasplantes endometriales reveló importantes variaciones estructurales. A las 3 semanas en el ojo, muchos trasplantes presentaban estroma y glándulas (Fig. 17a); mientras que otros, estaban constituidos únicamente por estroma (Fig. 17b). Algunos trasplantes desarrollaron una cavidad central, adquiriendo así una estructura quística (Fig. 17c). A las seis semanas en la CAO, algunos de los trasplantes conservaban los rasgos antes descritos, pero otros presentaban una estructura más pobre en células y pérdida de los componentes glandulares. Estos trasplantes estaban formados mayormente por matriz extracelular, conservando pocas células y algunos vasos sanguíneos (Fig. 17d).

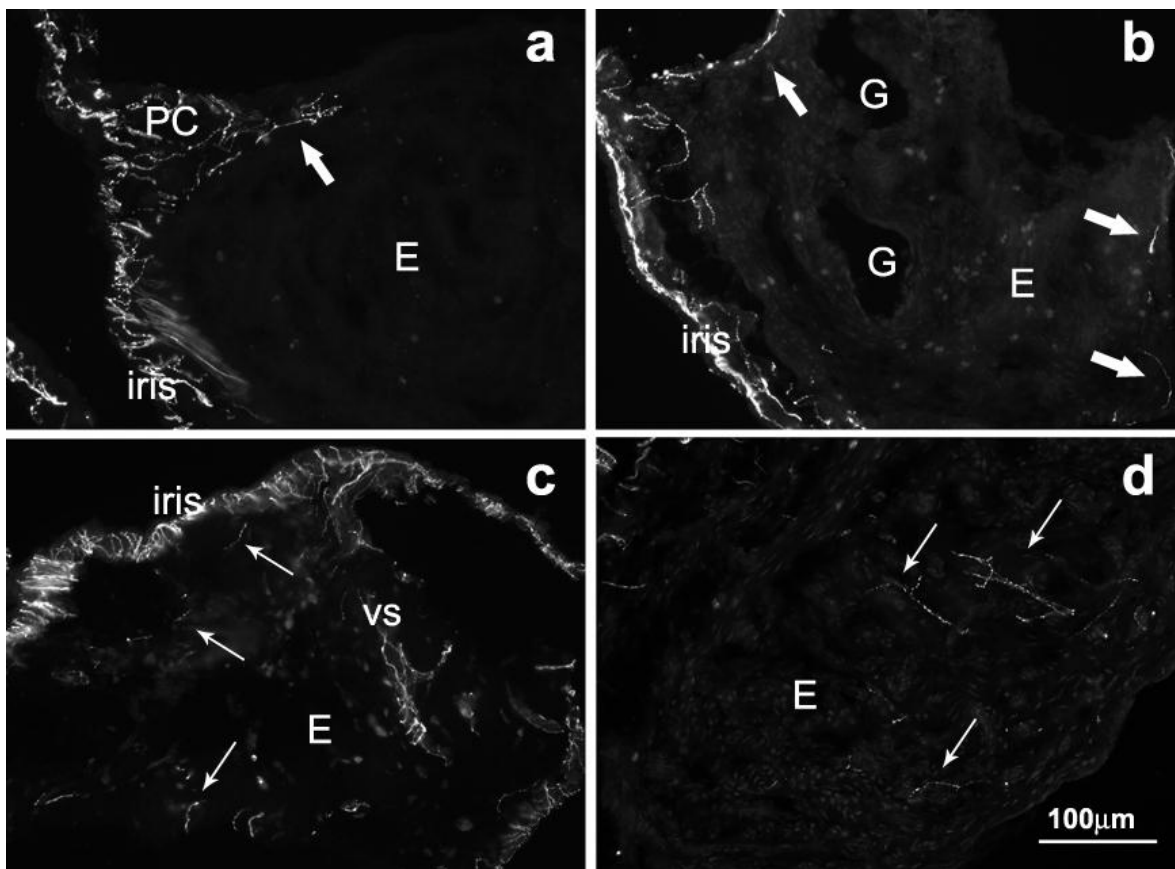


**Figura 17.** Cortes a congelación de trasplantes de endometrio luego de tres (a,b,c) y seis (d) semanas en la cámara anterior del ojo. En las imágenes se muestra la histología de los trasplantes teñidos con hematoxilina y eosina; **a:** trasplante formado por estroma (E) y glándulas (G); **b:** trasplante formado únicamente por estroma (E) en el que se reconocen algunos vasos sanguíneos (V); **c:** trasplante en forma de quiste que presenta una cavidad central revestida por epitelio endometrial. En el estroma que rodea la luz del quiste se observan numerosas glándulas (G); **d:** trasplante que ha estado en la CAO por seis semanas y en el que ha ocurrido una importante migración celular. Se observan algunos vasos sanguíneos (V). I= iris de la hospedera; co: cornea de la hospedera.

## 2. Reinervación simpática de los trasplantes en la CAO

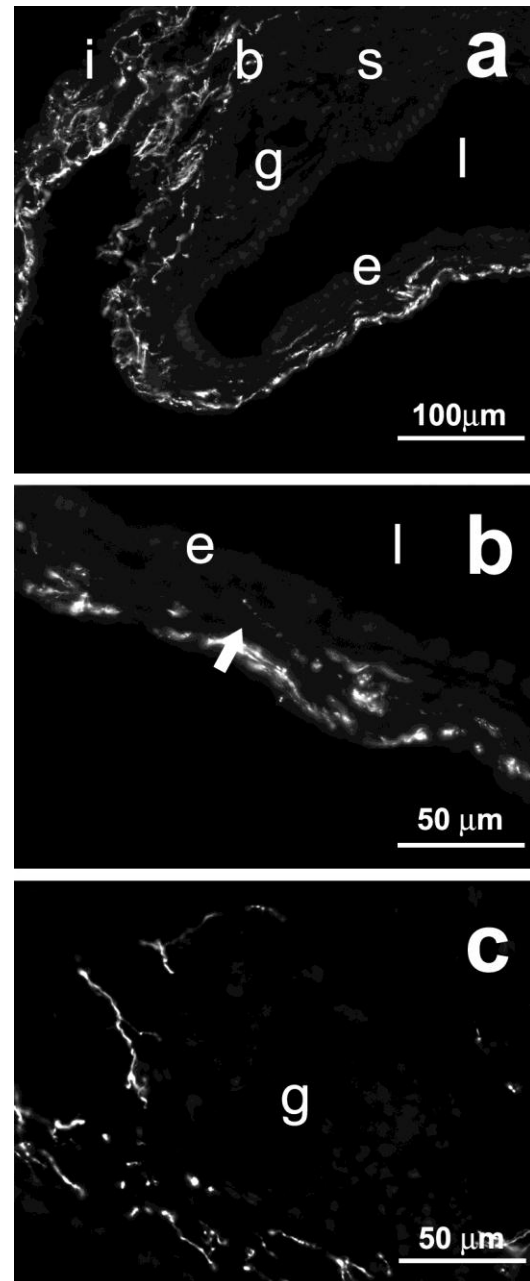
El análisis de los trasplantes endometriales inmunomarcados con el anticuerpo contra la tirosina hidroxilasa, mostró la presencia de nervios simpáticos en todos los tiempos de permanencia en la CAO analizados. Luego de una semana en el ojo, la mayoría de los nervios estaban localizados en la periferia del trasplante y no penetraban profundamente en su interior (Fig. 18a). En las etapas siguientes (2, 3 y 6 semanas en el ojo) los nervios

invadían el interior de los trasplantes, donde se distribuían en el estroma (Fig. 18b), en la cercanía de las glándulas (Fig. 18c) y asociados con los vasos sanguíneos (Fig. 18c).



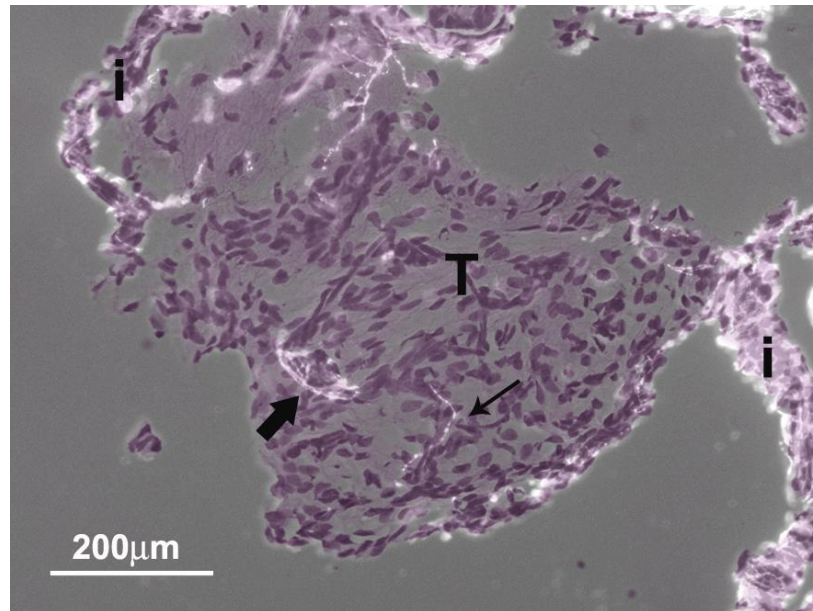
**Figura 18.** Muestra la inervación simpática de los trasplantes endometriales a distintos tiempos de permanencia en la CAO: 1 semana (**a**), 2 semanas (**b**), 3 semanas (**c,d**). Las flechas gruesas en a y b, indican fibras nerviosas que rodean al trasplante. Las flechas finas en c y d, señalan las fibras nerviosas que han penetrado al trasplante y se asocian con los vasos sanguíneos (vs). E, estroma endometrial; G, glándulas; PC, puente conectivo que ancla al trasplante al iris de la hospedera.

Es importante señalar, que la presencia de nervios simpáticos fue independiente de las variaciones morfológicas observadas en los trasplantes, visualizándose fibras nerviosas tanto en los trasplantes que permanecieron como masas sólidas compuestas sólo por estroma, como en los que presentaban estroma y glándulas. Los trasplantes que desarrollaron una cavidad central y formaron estructuras de tipo quísticas, también mostraron la presencia de nervios simpáticos en su pared (Figs. 19 a,b,c). Algunas de estas fibras se aproximaban al epitelio que revestía la luz del quiste (Fig. 19b) mientras que otras aparecían en las proximidades de las glándulas endometriales (Fig. 19c).



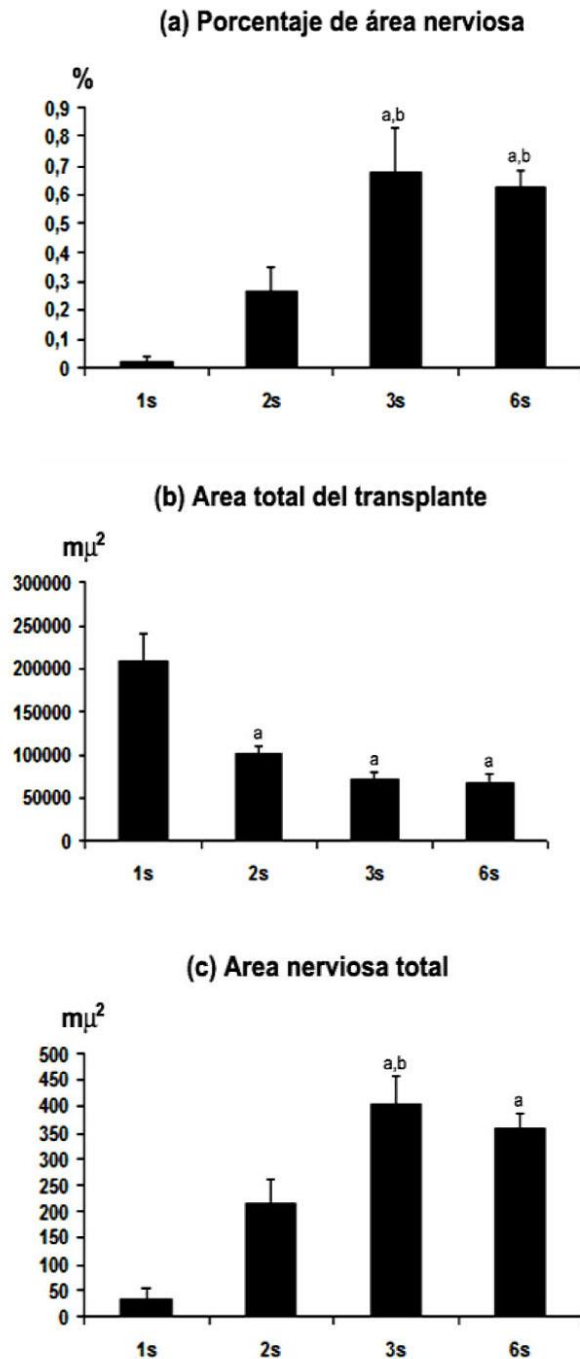
**Figura 19.** Muestra la inervación simpática de los trasplantes intraoculares de endometrio que desarrollaron la forma de quistes (3 semanas). Algunas fibras nerviosas son observadas en las proximidades del epitelio (e) que reviste la luz del quiste (l), (flecha en b) y otras en asociación con las glándulas endometriales (g). b: puente conjuntivo; i: iris de la hospedera.

También los trasplantes que a las 6 semanas en el ojo estaban formados casi exclusivamente por matriz extracelular y presentaban pocas células, estaban inervados por nervios simpáticos. Interesantemente, la superposición de la imagen de los nervios a la imagen histológica mostró que en estos trasplantes, la mayoría de los nervios estaba asociada con las escasas células presentes en los trasplantes y con pequeños vasos sanguíneos (Fig. 20).



**Figura 20.** Muestra la imagen de un trasplante endometrial que ha permanecido en el ojo por 6 semanas y en el que ha ocurrido una importante migración celular. Esta imagen se logró luego de superponer a la imagen de los nervios (marcados con anti-TH) la imagen histológica (azul de toluidina). Se observa la presencia de algunas fibras nerviosas en la periferia del trasplante y otras que corren por el estroma (flechas finas) o están asociadas con los vasos sanguíneos (flecha gruesa).

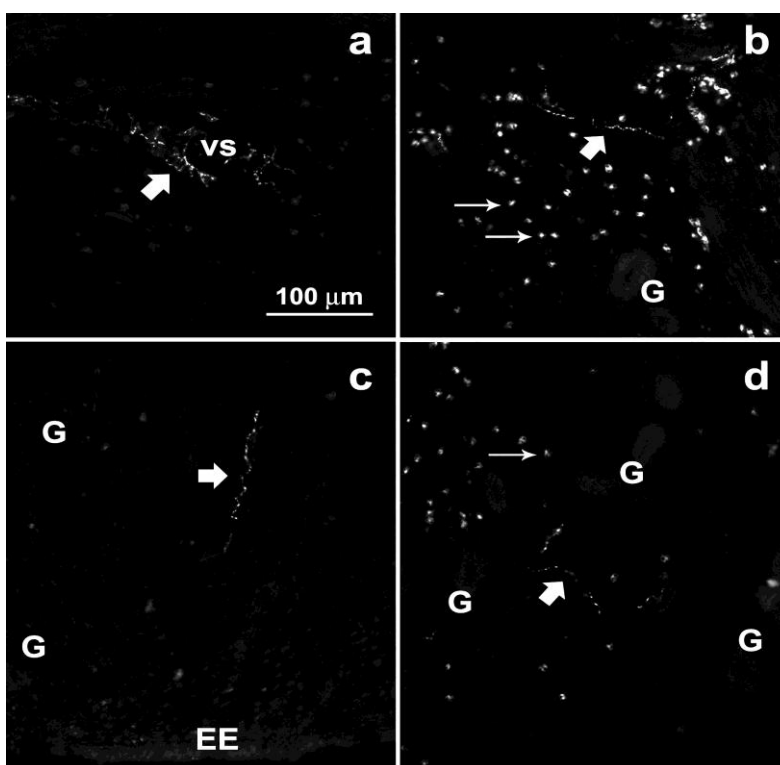
Los estudios cuantitativos de densidad de inervación realizados sobre los trasplantes sólidos, mostraron que el porcentaje de área del trasplante ocupada por los nervios (% de área nerviosa) se incrementaba significativamente hacia las 3 semanas en el ojo y permanecía estable entre las 3 y las 6 semanas (Fig. 21a). Con el fin de determinar si este incremento se debía a una reducción en el tamaño de los trasplantes, se calculó el área nerviosa total, que resulta de multiplicar el porcentaje de área nerviosa por el área total del trasplante y dividir el valor resultante por 100. El estudio de la variación del tamaño de los trasplantes reveló que a la semana de ser transplantados a la CAO el área de los mismos mostraba una reducción de siete veces respecto de su tamaño inicial. Entre la primera y segunda semana en ojo, el área del trasplante sufre una reducción adicional de casi tres veces, por lo que respecto del tamaño inicial, el explanto se reduce aproximadamente 21 veces (Fig. 21b). A pesar de esta reducción, el área nerviosa total mostró un aumento entre la primera y tercera semana, mostrando una pequeña reducción a las 6 semanas (Fig. 21c).



**Figura 21.** Resultados de los estudios cuantitativos de densidad de fibras nerviosas de los trasplantes luego de 1,2,3 y 6 semanas (s) de permanencia en la cámara anterior del ojo. Hacia las 3s se observó un aumento en el porcentaje de área nerviosa (a). A pesar de que los trasplantes mostraron una reducción de tamaño hubo un aumento en el área nerviosa total (b,c). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM ( $n= 12-14$ ). Los datos fueron comparados mediante un ANOVA de una vía seguido del test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. **a:** diferencia significativa respecto de 1s; **b:** diferencia significativa respecto de 2s.

### 3. Inervación simpática del endometrio eutópico

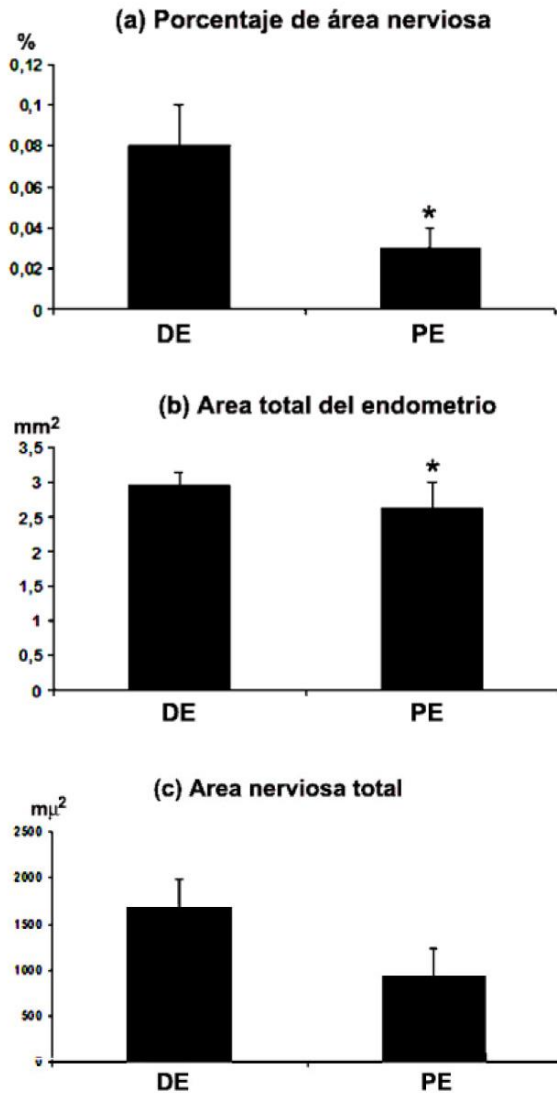
El examen de los cortes de útero inmunomarcados con el anticuerpo contra la TH, mostró que tanto en el proestro (Figs. 22a,c) como en el diestro (Figs. 22b,d), el endometrio presentaba una inervación simpática escasa. Estas fibras nerviosas estaban asociadas con los vasos sanguíneos localizados preferentemente en la región basal del endometrio (Fig. 22a), mientras que otras corrían aisladamente por el estroma que rodea a las glándulas endometriales (Figs. 22b,d). Algunas fibras penetraban profundamente en el endometrio, acercándose a la superficie epitelial que reviste la luz del útero (Fig. 22c).



**Figura 22.** Ilustra cortes a congelación del endometrio uterino de ratas adultas en diestro (a,c) y proestro (b,d). En ellas se muestran fibras nerviosas simpáticas, TH-positivas (flechas gruesas) asociadas a los vasos sanguíneos (vs, en a), el estroma que rodea a las glándulas endometriales (G) y en las cercanías del epitelio endometrial (EE, en c). Las flechas finas en b y d, señalan los leucocitos eosinófilos (auto-fluorescentes) que invaden el endometrio en el proestro.



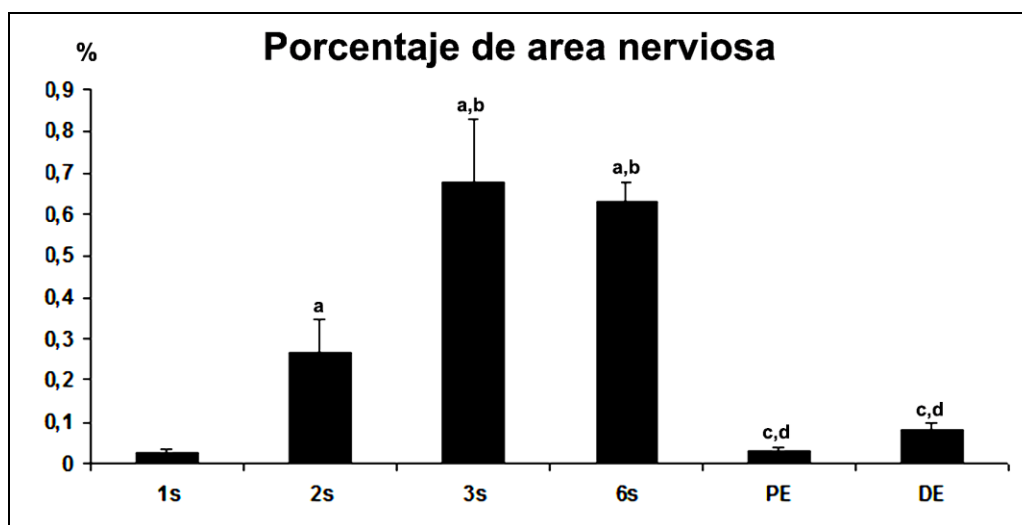
El examen cuantitativo de la densidad de inervación, mostró que el porcentaje de área nerviosa es menor en proestro que en diestro, mostrando una reducción del 62,5% (Fig. 23a). Luego de corregir estos datos por el área total del endometrio (Fig. 23b), se observó que el área nerviosa total no sufría alteraciones estadísticamente significativas, aunque en términos numéricos la misma era casi el doble en diestro que en proestro (Fig. 23c).



**Figura 23.** Resultados de los estudios cuantitativos de densidad de fibras nerviosas en el endometrio uterino eutópico en diestro (DE) y proestro (PE). El porcentaje de área nerviosa es mayor en DE (a). Si bien se observó que en DE el área nerviosa total es mayor que en PE esta diferencia no es estadísticamente significativa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM ( $n=3$ ). Los datos fueron comparados mediante el test  $t$  de Student. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*).

#### 4. Comparación de la reinervación de los trasplantes de endometrio a la CAO con la del endometrio eutópico.

La comparación de la densidad de inervación de los trasplantes con el endometrio eutópico, mostró que a las 3 y 6 semanas en el ojo, el porcentaje de área nerviosa ocupada por los nervios simpáticos en los trasplantes era significativamente superior a la del endometrio eutópico (Fig. 24). Así, el porcentaje de área nerviosa de los trasplantes fue casi 22 veces mayor que en el endometrio eutópico en proestro y 8 veces mayor en diestro. Debido a las grandes diferencias de tamaño en el área total de los trasplantes endometriales y el endometrio eutópico, no se establecieron comparaciones entre las áreas nerviosas totales.



**Figura 24.** Resultados comparativos de los estudios cuantitativos de densidad de fibras nerviosas simpática de los trasplantes luego de 1,2,3 y 6 semanas (s) de permanencia en la cámara anterior del ojo y del endometrio eutópico en proestro y diestro. Se observó que el porcentaje de área nerviosa de los trasplantes fue mayor en el endometrio eutópico. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. Los datos fueron comparados mediante un ANOVA de una vía seguido del test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. **a:** diferencia significativa respecto de 1s; **b:** diferencia significativa respecto de 2s; **c:** diferencia significativa respecto de 3s; **d:** diferencia significativa respecto de 6s.

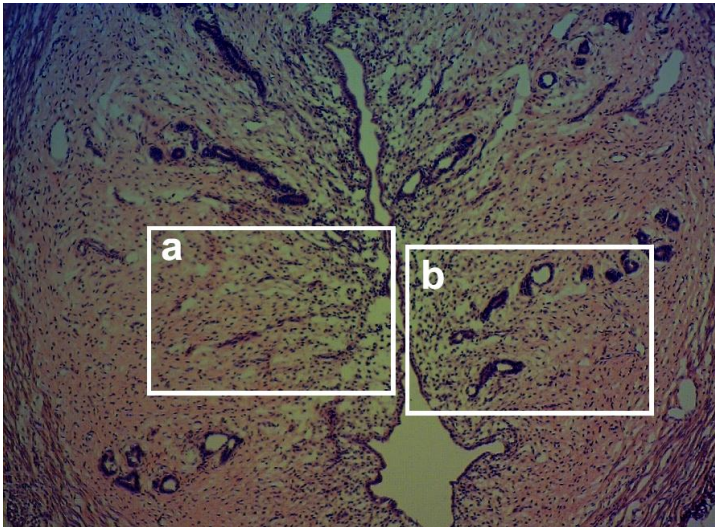
DISCUSION Y CONCLUSIONES

## 1. Evolución de los trasplantes en la cámara anterior del ojo

Dado que los tejidos transplantados a la CAO suelen conservar su morfología y sus funciones naturales, este modelo ha sido recurrentemente usado para la investigación y más recientemente, con fines terapéuticos (Speier & col., 2007; Leibiger & col., 2011). Sin embargo, la capacidad del tejido endometrial aislado de sobrevivir y mantener sus propiedades morfológicas y funcionales en la CAO no ha sido nunca investigada. Por esta razón, nuestro estudio comenzó evaluando la evolución de los trasplantes endometriales en este sitio.

Los trasplantes endometriales mostraron importantes variaciones histológicas. Algunos permanecieron como masas sólidas compuestas por estroma y glándulas o sólo por estroma, mientras que otros desarrollaron una cavidad central, adquiriendo así una estructura quística. Los factores que determinan la heterogeneidad morfológica observada en los trasplantes endometriales en la CAO no son aún claros. Una posible explicación podrían brindarla el tamaño inicial y la composición tisular de los fragmentos endometriales transplantados a la CAO. Cabe recordar que en el útero, el endometrio presenta regiones donde predomina el estroma y otras regiones donde se observa la presencia de estroma y glándulas (Fig. 25).

Dado que los trasplantes intraoculares son de un tamaño pequeño, es probable que la ausencia de glándulas en algunos trasplantes se deba a que los fragmentos iniciales carecían de estas estructuras. También el tamaño inicial de los trasplantes favorecería la formación de los quistes, siendo los explantos más grandes y con más variedad de componentes endometriales, los que tienen mayores posibilidades de formar estas estructuras.



**Figura 25.** Ilustra un corte de endometrio uterino teñido con H&E. En él se han recuadrado dos regiones. En **a**, se observa una zona del endometrio desprovista de glándulas, mientras que en **b** se muestra una región que posee estas estructuras.

Aunque en la ENDO humana, la mayor parte de las lesiones están formadas por estroma y glándulas, se han observado casos en los que los endometriomas estaban compuestos únicamente por estroma. Esto dificulta su diagnóstico anátomo-patológico basado en la tinción con H&E, lo que resulta en un aumento de falsos negativos. En estos casos, para confirmar el diagnóstico de endometriosis se utiliza un marcador específico para el estroma endometrial que consiste en la detección de una metaloendopeptidasa de la superficie celular mediante el empleo de un anticuerpo conocido como CD10 (Potlog-Nahari & col., 2004).

Nuestros estudios mostraron también que a las seis semanas en el ojo, algunos transplantes presentaban pocas células estromales y ninguna estructura glandular. Esto no es del todo sorprendente, ya que las células endometriales tienen una gran capacidad migratoria y esta capacidad está en la base de la génesis de la endometriosis. Más aún, se ha observado que las células de los endometriomas humanos son capaces de evadirse hacia otros territorios utilizando la vía perineural (Anaf & col., 2002; Clement, 2007).

También, el pequeño tamaño de los transplantes y la ausencia de miometrio, podría favorecer la pérdida de estructura del tejido. Cabe señalar, que la inmensa mayoría de los trabajos realizados que han usado el autotransplante a la cavidad peritoneal como modelo de endometriosis experimental, utilizan para los mismos fragmentos relativamente grandes de tejido (0.5 x 0.5 mm) e incluyen además toda la pared uterina (endometrio +

miometrio). Esta diferencia podría favorecer la formación de los quistes y daría a los mismos una integridad estructural que limitaría la migración de las células endometriales. Pensamos que el utilizar transplantes de toda la pared uterina no emula totalmente la patología humana, si bien se ha observado que en ciertos casos de ENDO espontánea, se detecta la presencia de tejido muscular liso, que se plantea surgiría de la diferenciación de las células intersticiales de los endometriomas (Odagiri & col, 2009).

## **2. Reinervación simpática de los transplantes en la CAO**

El análisis de la inervación de los transplantes endometriales mostró la presencia de nervios simpáticos luego de todos los tiempos de permanencia en la CAO analizados. Estos nervios llegaban al trasplante acompañando a los vasos sanguíneos que cursaban por los puentes conjuntivos que anclaban los transplantes al iris de los animales hospederos.

Se observó que en etapas tempranas, las fibras nerviosas simpáticas se localizaban en la periferia de los transplantes; pero posteriormente los invadían, distribuyéndose en el estroma, en la cercanía de las glándulas y en asociación con los vasos sanguíneos. Interesantemente, la presencia de nervios simpáticos fue independiente de las variaciones histológicas observadas en los transplantes, observándose fibras nerviosas tanto en los transplantes que permanecieron como masas sólidas compuestas sólo por estroma, como en los que presentaban estroma y glándulas o los que formaron estructuras de tipo quístico. También los transplantes que a las 6 semanas en el ojo presentaban pocas células estaban inervados por los nervios simpáticos, los que aparecían asociados con cordones celulares que fueron interpretados como vasos sanguíneos.

Los estudios cuantitativos de densidad de inervación mostraron que el porcentaje de área del trasplante ocupada por los nervios se incrementaba significativamente hacia las 3 semanas en el ojo y permanecía estable entre las 3 y las 6 semanas. Estos resultados indican que a pesar de la marcada disminución de tamaño observado en los transplantes endometriales en la CAO, estos fueron capaces de promover el ingreso y posterior crecimiento de los nervios simpáticos. En este aspecto, los transplantes endometriales se comportaron como otros tejidos que normalmente se encuentran inervados por el sistema nervioso autónomo, incluyendo el miometrio (Brauer & col., 2000, 2002, 2008).

Los estudios de trasplantes de pared uterina a la cavidad peritoneal, también han mostrado que estos explantos son reinervados por los nervios simpáticos y otros tipos de nervios ([Berkley & col., 2005](#)). Sin embargo, la reinervación de estos trasplantes ocurre luego de varias semanas. La rápida reinervación de los trasplantes de endometrio a la CAO podría vincularse con el pequeño tamaño de los trasplantes, así como también por la ausencia de miometrio.

También, la alta densidad de inervación simpática del iris podría contribuir a la rápida reinervación de los trasplantes endometriales en la CAO. Estudios previos han mostrado que en la ENDO humana, la densidad de inervación es mayor en los focos que se localizan en las profundidades del órgano afectado (endometriosis infiltrante profunda) que en aquéllos que se sitúan en la superficie de los mismos. Se postula que la pequeña distancia entre los endometriomas y las áreas del órgano donde se localiza su inervación, facilitaría la rápida y más extensa reinervación de los focos endometriales, lo que a su vez se ha vinculado con la magnitud del dolor provocado por estas lesiones ([Wang & col., 2009](#); [Fraser, 2010](#)).

### **3. Inervación simpática del endometrio eutópico**

El examen del endometrio eutópico de las ratas adultas mostró que el mismo estaba pobremente inervado por los nervios simpáticos. Estas fibras nerviosas aparecían asociadas con los vasos sanguíneos localizados preferentemente en la región basal del endometrio, mientras que otras corrían aisladamente por el estroma que rodea a las glándulas endometriales. Algunas fibras aisladas penetraban profundamente en el endometrio, acercándose a la superficie epitelial que reviste la luz del útero. En este sentido, el endometrio de la rata muestra una diferencia significativa respecto del endometrio humano, en el cual la inervación se encuentra restringida a la capa basal, estando la capa funcional totalmente desprovista de nervios. Interesantemente, en las mujeres afectadas por la endometriosis, se observa la presencia anormal de fibras nerviosas en la capa funcional. Más aún la presencia de estas fibras se evalúa actualmente como posible herramienta diagnóstica para esta patología ([Al-Jefout & col., 2007, 2009](#)).

El examen cuantitativo de la densidad de inervación del endometrio eutópico, mostró que el porcentaje de área nerviosa era menor en proestro que en diestro, lo cual indicaría que

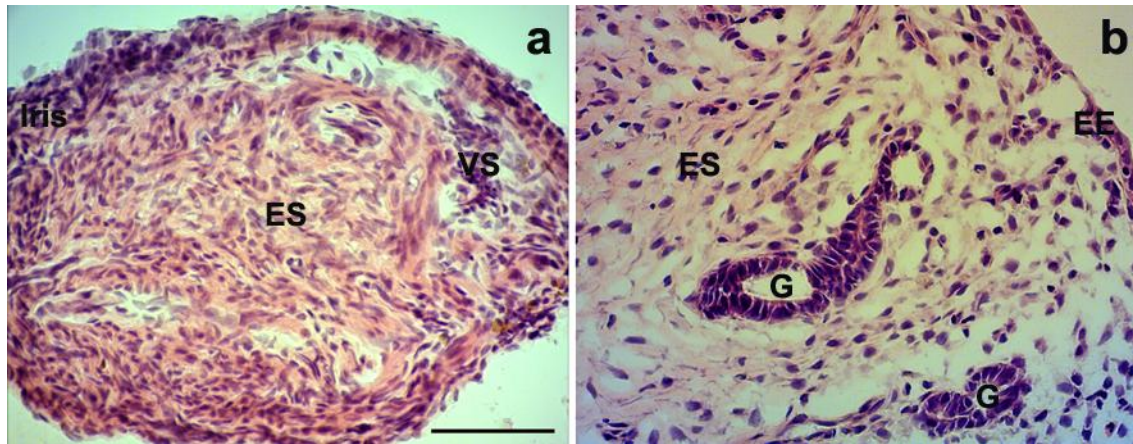
la inervación endometrial sufre cambios cíclicos similares a los detectados en el miometrio uterino (Zoubina & col., 1998). Sin embargo, luego de corregir los datos de densidad de inervación por el área total del endometrio, se observó que el área nerviosa total no sufría alteraciones estadísticamente significativas. Estos resultados indican que la disminución en la densidad aparente de inervación que se observa en el proestro se asociaría más con una “dilución” de la inervación en un área mayor de tejido que con una real pérdida (degeneración) de fibras nerviosas terminales. Esta “dilución” coincide con el fenómeno de hipertrofia y edema que se observa en el endometrio en respuesta al estrógeno. Este proceso de aparente “dilución” contrasta con los fenómenos de degeneración y regeneración que se observan en el miometrio durante el ciclo estral natural de la rata (Zoubina & Smith, 2000).

#### **4. Comparación de la reinervación de los trasplantes de endometrio a la CAO con la inervación de endometrio eutópico**

La densidad aparente de inervación, valorada como porcentaje de área ocupada por los nervios simpáticos, fue muy superior en los trasplantes intraoculares que en el endometrio eutópico tanto en proestro como en diestro.

Debido a la gran diferencia de tamaño entre el área del endometrio eutópico y los trasplantes intraoculares, no se realizaron medidas de área nerviosa total, parámetro que independiza de los cambios en el tamaño del tejido. A pesar de ello, la estimación aproximada de la reducción del tamaño de los trasplantes en la CAO mostró que a las 3 semanas en el ojo, el tejido transplantado se reduce de tamaño aproximadamente unas 21 veces. Esta reducción, se refleja en el mayor “empaquetamiento” de las células del estroma en los trasplantes respecto del endometrio normal (Figs. 26 a,b). Esta reducción de tamaño coincide casi perfectamente con el aumento en el porcentaje de área nerviosa, lo que indicaría que la cantidad de nervios presentes en el pequeño fragmento de endometrio que sobrevive en la CAO luego de tres semanas es igual a la cantidad de nervios que están presentes en un área comparable de endometrio eutópico. Esto apunta a confirmar que en la CAO, la capacidad de reinervación del endometrio por los nervios simpáticos es comparable a la inervación del endometrio eutópico.



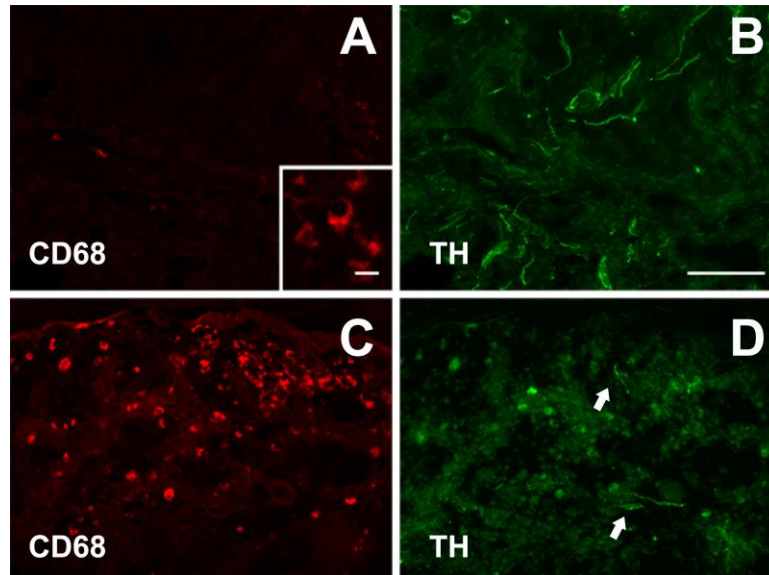


**Figura 26.** Ilustra cortes a congelación teñidos con H&E de: **(a)** un trasplante de endometrio sólo compuesto por estroma; y **(b)** una región de endometrio de rata adulta en proestro. Nótese el diferente grado de empaquetamiento de las células del estroma (ES). EE, epitelio endometrial; G, glándulas endometriales; VS, vaso sanguíneo. Barra de calibración en (a) = 100  $\mu$ m.

## 5 Regulación de la reinervación de los trasplantes endometriales en la CAO

Los factores que favorecen la reinervación de los trasplantes a la CAO no son aún completamente claros. Se ha demostrado que los endometriomas peritoneales tanto espontáneos como experimentales producen NGF y otras neurotrofinas que favorecen el crecimiento de los nervios simpáticos (ej. la Neurotrofina-3, NT3), (Anaf & col., 2002; Mechsner & col., 2007; Zhang & col., 2008). Por otra parte los macrófagos que invaden la zona de lesión aportan también neurotrofinas, y como se mencionara en los antecedentes, se ha observado una estrecha correlación entre la densidad de inervación de los endometriomas y el número de macrófagos (Tran & col., 2009).

También es posible que, al igual que en la ENDO humana, la presencia de macrófagos favorezca la reinervación del endometrio en la CAO. Datos preliminares de nuestro grupo (Texidor-Frugoni & col., 2011) mostraron la presencia de estas células en los trasplantes intraoculares de endometrio, aunque aparentemente no existiría una correlación entre la densidad de inervación y la de macrófagos (Fig. 27). Desconocemos aún cual es el papel de estas células y si están o no vinculadas con la reinervación del endometrio en la CAO. Estudios posteriores serán necesarios para evaluar los factores que regulan la inervación del endometrio en su localización eutópica y ectópica.



**Figura 27.** Ilustra cortes de transplantes endometriales que han permanecido en el ojo por 3 semanas. En los mismos se ha realizado una doble marcación, utilizando el anticuerpo monoclonal CD68 para visualizar los macrófagos (células rojas) (A,C) y un anticuerpo policlonal contra la tirosina hidroxilasa para visualizar los nervios simpáticos (en verde) (B,D). Barras de calibración: 100 $\mu$ m. La barra en el inset representa 10 $\mu$ m.

## CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en este trabajo indican que, al igual que otros tejidos, el endometrio aislado es capaz de sobrevivir y mantener su estructura en la cámara anterior del ojo. Esto abre interesantes posibilidades respecto de la utilización de la CAO como sitio alternativo de transplante para estudiar la endometriosis experimental. Nuestros estudios mostraron también que los trasplantes intraoculares de endometrio eran reinervados por los nervios simpáticos, lo que indicaría que el endometrio posee la capacidad intrínseca de atraer y sostener el crecimiento de los nervios simpáticos fuera de su localización natural. Sin embargo, el ambiente peritoneal y el proceso inflamatorio desencadenado por la presencia de los endometriomas, no parecen ser imprescindibles para que ocurra la reinervación del endometrio en localizaciones ectópicas. Los trasplantes endometriales a la CAO mostraron la presencia de algunas células inflamatorias, tales como los macrófagos. Esto genera la posibilidad de que los factores neurotróficos producidos por estas células contribuyan a la reinervación de los trasplantes en la CAO. Estudios posteriores serán necesarios para evaluar los factores que regulan la inervación del endometrio eutópico y su reinervación en localizaciones ectópicas durante el curso de la endometriosis.

- Al-Jefout M, Andreadis N, Tokushige N, Markham R, Fraser IS (2007) A pilot study to evaluate the relative efficacy of endometrial biopsy and full curettage in making a diagnosis of endometriosis by the detection of endometrial nerve fibers. *Amn. J. Obstetrics & Gynecol.* 578 e1- 578e4.
- Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe GM, Markham R, Fraser IS (2009) Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study. *Human Reprod.* 24: 3019-3024.
- Anaf V, Simon Ph, Nakadi I EL, Fayt I, Buxant F, Simonart Th, Peny MO, Noël JC (2000a) Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules. *Human Reprod.* 15: 1744-1750.
- Anaf V, Simon Ph, Fayt I, Noël JC (2000b) Smooth muscles are frequent of endometriotic lesions. *Human Reprod.* 15: 767- 77.
- Anaf V, Simon P, El Nakadi I, Fayt I, Simonart T, Buxant F, Noël JC (2002) Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. *Human Reprod.* 17: 1895-1900.
- Asante A, Taylor R (2011) Endometriosis: The role of neuroangiogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 73: 163-182.
- Barcena de Arellano ML, Arnold J, Vercellino F, Chiantera V, Schneider A, Mechsner S (2011) Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions. *Fertil. Steril.* 95: 1123-1126.
- Batista AP, Conceicao AP, Moraes EF, Teixeira AA, Wanderley-Teixeira V (2006) Histological evaluation of the induced endometriosis in rats after treatment with dexamethasone. *Int. J. Morphol.* 24: 565-570.
- Bengel FM, Ueberfuhr P, Schiepel N, Nekolla SG, Reichart B, Schwaiger M (2001) Effect of sympathetic reinnervation on cardiac performance after heart transplantation. *N. Engl. J. Med.* 345:731-738.
- Berbic M, Fraser LS (2011) Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *J. Reprod. Immunol.* 88: 149-155.
- Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, Papka RE. (2004) Innervation of ectopic endometrium on a rat model of endometriosis. *PNAS* 101: 11094-11098.
- Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE (2005) The pains of endometriosis. *Science* 308: 1587-1589.
- Bianchimano P, Frias AI, Richeri A, Brauer MM. (2007) Effects of dexamethasone on estrogen- and pregnancy-induced plasticity in uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res.* 330: 413-431.
- Brauer MM, Burnstock G, Thrasivoulou C, Cowen T (1998) In oculo transplants of myometrium from postpartum guinea pigs fail to support sympathetic reinnervation. *J Anat.* 193: 509-517.
- Brauer MM, Chávez-Genaro R, Llodrá J, Richeri A, Scorza C (2000) Effects of chronic oestrogen treatment are not selective for uterine noradrenaline-containing sympathetic nerves: a transplantation study. *J Anat.* 196: 347-355.
- Brauer MM, Chávez-Genaro R, Richeri A, Viettro L., Frias AI, Burnstock G, Cowen T. (2002) The oestrogenized rat myometrium inhibits organotypic sympathetic reinnervation. *Autonomic Neurosci: Basic and Clinic* 101: 13.

- Brauer MM. (2008) Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. Review. *Autonom. Neurosci.* 140:1-16.
- Cantarelli E, Piemonti L (2011) Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr. Diab.Rep.* 11: 364-374.
- Clement PB (2007) The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Adv Anat Pathol.* 14: 241-60.
- De Arellano ML, Arnold J, Vercellino F, Chiantera V, Ebert AD, Schneider A, Mechsner S (2011) Influence of nerve growth factor in endometriosis-associated symptoms. *Reprod. Sci.* 18: 1202-1210.
- Do Amaral V, Andrezza Dal Lago E, Kondo W, Guarita LC, Fransisco JC (2009) Development of an experimental model of endometriosis in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 36: 250-255.
- Farquhar C (2007) Endometriosis. *BMJ.* 334: 249-253.
- Fawcett DW (1992) Sistema reproductor femenino. *Tratado de histología.* 12ª edición Mexico, Interamericana. McGraw. Hill. 885-932.
- Fazleabas AT, Brudney A, Gurates B, Chai D, Bulun S (2002) A modified baboons model for endometriosis. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 955: 308-317.
- Fedele L, Bianchi S, Arcaini L, Vercellini P, Candiani GB (1988) GnRH agonists in the treatment of endometriosis. *Acta Eur. Fert.* 19: 5-12.
- Ferretti A, Boschi E, Stefani A, Spiga S, Romanelli M, Lemmi M, Giovannetti A, Longoni B, Mosca F (2003) Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant. *Life Sci.* 73: 1985-1994.
- Fraser IS (2010) Mysteries of endometriosis pain: Chien-Tien Hsu Memorial Lecture 2009. *J. Obstet. Gynaecol. Res* 36: 1-10.
- Gazvani R, Templeton A (2002) Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 123: 217-226.
- Giudice LC, Tazuke SI, Swiersz L (1998) Status of current research on endometriosis. *J. Reprod. Med.* 43: 252-262.
- Giudice LC, Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet.* 364: 1789-99.
- Groothuis PG, Dassen HHNM, Romero A, Punyadeera C (2007) Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human Reprod.* 13: 405-417.
- Grummer R. (2006) Animal models in endometriosis research. *Human Reprod.* 12:641-649.
- Guyton AC, Hall JE (2006) Fisiología femenina antes del embarazo y hormonas femeninas. *Tratado de fisiología medica*, 11ª edición. Barcelona, Elsevier, 1011-1026.
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM (1984) Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *J. Obstet. Gynecol.* 64: 151-154.

- Hasan W, Jama A, Donohue T, Wernli G, Onyszchuk G, Al-Hafez B, Bilgen M, Smith PG (2006) Sympathetic hyperinnervation and inflammatory cell NGF synthesis following myocardial infarction in rats. *Brain Res.* 1124:142-54.
- Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. (1998) Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Human Reprod.* 4:736-740.
- Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Morimoto C, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y (2005) Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Human Reprod.* 20: 2092-2096.
- Hori J (2008) Mechanism of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *J Ocul Biol Dis Infor.* 1:94-100.
- Hori J, Vega JL, Masli S (2010) Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 18: 325-333.
- Hsu AL, Khachikyan I, Stratton P (2010) Invasive and non-invasive methods for the diagnosis of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 53: 413-419.
- Itoga T, Matsumoto T, Takeuchi H, Yamasaki S, Sasahara N (2003) Fibrosis and smooth muscle metaplasia in rectovaginal endometriosis. *Pathology International.* 53: 371-375.
- Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Ishimaru T (2004) Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum. *Fertil. Steril.* 81: 652-661.
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H (2010) Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Human Reprod.* 25:642-653.
- Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH (1998) Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Human Reprod. Hum Reprod Update.* 4: 741-751.
- Leibiger IB, Caicedo A, Berggren PO (2011) Non-invasive in vivo imaging of pancreatic  $\beta$ -cell function and survival - a perspective. *Acta Physiol* 204: 178-185.
- Long J A, Evans H M (1922) The estrous cycle in the rat and associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.* 6. University of California Press, Berkeley.
- Maruyama T, Yoshimura Y (2008) Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocrine Journal.* 55: 795-810.
- McLean DB, Bennett B, Morris M, Wheeler FB (1989) Differential regulation of calcitonin gene related peptide and substance P in cultured neonatal rat vagal sensory neurons. *Brain Res.* 478: 349-355.
- Mechsner S, Schwarz J, Thode J, Lodenkemper C, Salomon DS, Ebert AD (2007) Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions. *Fertil Steril.* 88: 581-7.
- Medina M, Lebovic DI (2009) Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet. Gynecol.* 1-8.

- Nisolle M, Donnez J (1997) Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.* 68: 585-596.
- Nogueira Neto J, Torres OJ, Coelho TM, Nunes JN Jr, Aguiar GC, Costa LK (2007) Evaluation of the macroscopic growth degree of experimental endometriosis in rats. *Acta Cir Bras. Suppl* 1:8-11.
- Nothnick WB (2010) Endometriosis: in search of optimal treatment. *Minerva Ginecol.* 62: 17-31.
- Odagiri K, Cono R, Fujiwara J, Netsu S, Yang C, Suzuki M (2009) Smooth muscle metaplasia and innervation in interstitium of endometriotic lesions related to pain. *Fertil. Steril.* 92: 1525-1531.
- Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vanderputte M, Koninckx PR. (1991) Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertile. Steril.* 56: 45-51.
- Oral E, Olive DL, Arici A (1996) The peritoneal environment in endometriosis. *Human Reprod.* 2: 385-398.
- Potlog-Nahari C, Feldman AL, Stratton P, Koziol DE, Segars J, Merino M J, Nieman LK (2004) CD10 immunohistochemical staining enhances the histological detection of Endometriosis. *Fertil. Steril.* 82: 86-92.
- Ruocco I, Cuello AC, Ribeiro da-Silva A (2000) Peripheral nerve injury leads to the establishment of a novel pattern of sympathetic fiber innervation in the rat skin. *J. Comp.Neurol.* 422: 287-296.
- Sharpe-Timms K (2001) Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 943: 131-147.
- Shu XQ, Mendell LM (1999) Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 96: 7693-7696.
- Streilein JW (2003a) Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol.* 74: 179-185.
- Streilein JW (2003b) Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol.* 3: 879-889.
- Speier S, Nyqvist D, Cabrera O, Yu J, Molano RD, Pileggi A, Moede T, Köhler M, Wilbertz J, Leibiger B, Ricordi C, Leibiger IB, Caicedo A, Berggren P-O (2007) Noninvasive *in vivo* imaging of pancreatic islet cell biology. *Nature Medicine.* 14: 574-758.
- Taylor AW (2009) Ocular immune privilege. *Eye* 23: 1885-1889.
- Texidor C, Silveira P, Matínez G, Brauer MM (2011) Importancia de los macrófagos en la reinervación del endometrio ectópico en un modelo de endometriosis experimental (resumen). *Septima Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay.*
- Tirado-González I, Barrientos G, Tariverdian N, Arck PC (2010) Endometriosis research: animal models for the study of a complex disease. *J. Reprod. Immunol.* 86:141-147.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2006a) Nerve fibers in peritoneal endometriosis. *Human Reprod.* 11: 3001-3007.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2007) Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 88 795-803.

- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS (2008a) Effects of hormonal treatment on nerve fibers in endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 90: 1589-1598.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. (2008 b) Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 92: 1234-1239.
- Tokushige N, Russell P, Black K, Barrera H, Dubinovsky S, Markham R, Fraser IS (2010) Nerve fibers in ovarian endometriomas. *Fertil. Steril.* 94:1944-1947.
- Tran LVP, Tokushige N, Berbic M, Markham R, Fraser IS (2009) Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Human Reprod.* 1:1-7.
- Tulandi T, Felemban A, Chen MF. (2001) Nerve fibers and histopathology of endometriosis-harboring peritoneum. *J. AM. Assoc. Gynecol. Laparosc.* 8: 95-98.
- Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P (2004) Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Practice & Research.* 18: 177-200.
- Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. (1996) Immunological aspects of endometriosis. *Human Reprod.* 2: 371-384.
- Wang G, Tokushige N, Markham R, Fraser IS (2009) Rich innervation of deep infiltrating endometriosis. *Human Reprod.* 24: 827-834.
- Weiss L (1986) Sistema Reproductor femenino. *Histología.* 5ª edición. Argentina: El Ateneo. 25: 833-861.
- Wernli G, Hasan W, Bhattacharjee A, van Rooijen N, Smith PG (2009) Macrophage depletion suppresses sympathetic hyperinnervation following myocardial infarction. *Basic. Res. Cardiol.* 104:681-693.
- Zhang G, Dmitrieva N, Liu Y, McGinty KA, Berkley. (2008) Endometriosis as a neurovascular condition: estrous variations in innervation, vascularization and growth factor content of ectopic endometrial cysts in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294: R162-R171.
- Zoubina EV, Fan Q, Smith PG (1998) Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *J Comp Neurol.* 397: 561-571.
- Zoubina EV, Smith PG (2000) Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Auton Neurosci.* 84: 176-185.