



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Instituto de Biología y Medicina Experimental  
(IByME – CONICET)**

**Estudio del rol de Galectina-1 en el  
establecimiento y desarrollo de la  
endometriosis**

***Autor: Lic. Juan Ignacio Bastón***

***Directora de Tesis: Dra. Gabriela F. Meresman***

***Directora Adjunta de Tesis: Dra. Rosa I. Barañao***

***Consejera de Estudios: Dra. María F. Troncoso***

**2015**

## ESTUDIO DEL ROL DE GALECTINA-1 EN EL ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna que tiene una prevalencia elevada en la población de mujeres en edad reproductiva. Se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina formando lesiones que generalmente se localizan en los ovarios, en el peritoneo intestinal o en el septo rectovaginal. Los mecanismos fisiopatológicos involucrados en su etiopatogenia multifactorial aún no se conocen completamente. Sumado a esto, los tratamientos existentes en la actualidad no resultan completamente eficaces para contrarrestar el desarrollo de las lesiones endometriósicas, y por lo tanto sus resultados son muy variables al momento de mitigar los síntomas clínicos característicos de esta enfermedad: el dolor pélvico crónico y la infertilidad. Este conjunto de factores nos motivó a llevar a cabo la presente investigación para intentar lograr una comprensión más profunda de los mecanismos que intervienen en la fisiopatología de esta enfermedad, con la idea de aportar conocimientos que contribuyan en definitiva a mejorar la terapéutica de la endometriosis

Galectina-1 (Gal-1) es una lectina endógena que reconoce y se une a  $\beta$ -galactósidos que presentan en su estructura molecular unidades múltiples del disacárido: galactosa- $\beta$ -1-4-*N*-acetilglucosamina (LacNAc), dispuesto principalmente en las ramificaciones de los *N*- y *O*-glicanos complejos presentes en las glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular. Esta lectina desempeña importantes funciones pro-angiogénicas e inmunomoduladoras en la biología tumoral. Sin embargo, si bien la endometriosis se caracteriza por compartir parte de los mecanismos que conllevan al desarrollo del cáncer, no se ha descrito hasta el momento la función que cumple Gal-1 en la fisiopatología de esta enfermedad ginecológica.

En base a estos antecedentes, los objetivos principales de esta tesis fueron estudiar el rol de Gal-1 en la etiopatogenia de la endometriosis, como así también estudiar si el bloqueo de sus efectos a nivel peritoneal podría tener valor terapéutico.

Para abordar este estudio se analizó el patrón de expresión tisular de Gal-1 en las lesiones endometriósicas y en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, además se compararon los niveles de expresión proteica de esta lectina entre las lesiones ectópicas y el endometrio eutópico de pacientes afectadas por diversos grados de severidad de esta patología, y se evaluó el efecto de la inhibición de la expresión proteica de Gal-1 *in vitro* sobre la proliferación de las células estromales endometriales de pacientes con endometriosis y de pacientes controles. Por otra parte, también se abordó el estudio de uno de los principales procesos involucrados en la fisiopatología de la endometriosis: la angiogénesis. Por tal motivo, se estudió *in vivo* el efecto de Gal-1 sobre la vascularización y el crecimiento de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en un modelo murino de endometriosis experimental, y se evaluó en este mismo modelo el efecto del bloqueo específico de esta lectina a nivel peritoneal sobre el crecimiento y la vascularización de las lesiones.

En síntesis, en este trabajo de tesis doctoral se pudo demostrar que la expresión tisular de Gal-1 en el endometrio y en las lesiones endometriósicas se limita particularmente a las células estromales y endoteliales dado que esta lectina no se expresa en las células epiteliales. Además, se observó que el nivel de expresión proteica de Gal-1 es mayor en las lesiones ectópicas que en el endometrio eutópico de las pacientes que presentan un grado de severidad mínimo o leve de endometriosis, lo cual podría estar indicando que Gal-1 juega un papel primordial en los estadios tempranos concernientes al establecimiento y desarrollo de esta patología. Si bien no se encontraron diferencias sustanciales en los niveles de expresión de Gal-1 en el endometrio, ni de su concentración en el líquido peritoneal, entre las pacientes con endometriosis y las pacientes controles, sí se pudo establecer que Gal-1 tiene un efecto funcional diferencial que promueve la proliferación *in vitro* de las células estromales endometriales de las pacientes con endometriosis pero no de las células endometriales de las pacientes controles, aunque el glicofenotipo que presentan en su superficie celular es igualmente permisivo para la unión de esta lectina.

Además, mediante el uso del modelo murino de endometriosis experimental se pudo demostrar que la presencia de Gal-1 en la lesión, en el entorno peritoneal, o en ambos simultáneamente, es de vital importancia para el desarrollo vascular y el consecuente crecimiento de las lesiones *in vivo*, y que el efecto pro-angiogénico mediado por esta lectina es independiente de los efectos que potencialmente podrían estar ejerciendo otros factores

pro-angiogénicos claves como VEGF o la citoquina murina CXCL2-KC. Finalmente, se demostró que el bloqueo específico de Gal-1 a nivel peritoneal restringe la capacidad de vascularización y el crecimiento de las lesiones endometriósicas.

En base a estos resultados novedosos se puede concluir que Gal-1 juega un papel significativo en la fisiopatología de la endometriosis, dado que se comprobó que la presencia de Gal-1 es de vital importancia para promover la proliferación *in vitro* de las células estromales endometriales eutópicas, además del desarrollo vascular y el consecuente crecimiento de las lesiones endometriósicas *in vivo*. También se demostró que el bloqueo específico de esta lectina a nivel peritoneal limita el crecimiento de las lesiones, lo cual lleva a sugerir que en un futuro esta lectina podría convertirse un blanco terapéutico potencial que permita desarrollar tratamientos más eficaces para combatir la progresión y la sintomatología de esta enfermedad.

**PALABRAS CLAVE:** endometriosis, Galectina-1, fisiopatología, vascularización.

## STUDY OF THE ROLE OF GALECTIN-1 IN THE ONSET AND DEVELOPMENT OF ENDOMETRIOSIS

Endometriosis is a benign gynecologic disease with a high prevalence among women of reproductive age. It is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity reassembled as ectopic lesions which are generally located on the ovaries, intestinal peritoneum or rectovaginal septum. The pathophysiologic mechanisms involved in its multifactorial etiology are not yet entirely known. In addition, the current therapeutic treatments are not completely effective to counteract the endometriotic lesions development and are not totally successful in mitigating the clinical symptoms of the disease: chronic pelvic pain and infertility. This background reveals the importance to conduct studies aimed to investigate the potential mechanisms involved in the pathophysiology of the endometriosis and the consequent symptoms associated to this disease.

Galectin-1 (Gal-1) is an endogenous lectin that recognizes and binds to  $\beta$ -galactosides containing multiple units of the disaccharide: galactose- $\beta$ -1-4-*N*-acetylglucosamine (LacNAc) disposed on branched *N*- and *O*-glycans complexes present on the cell surface glycoproteins or glycolipids, and it coordinates a variety of physiologic and pathologic processes. This lectin is upregulated in tumor and inflammatory microenvironments, where it plays essential roles in angiogenesis and immune evasion mechanisms. Dysregulated angiogenesis and unbalanced inflammation are key components of the pathogenesis of endometriosis, which recapitulate cellular and molecular networks of the tumor microenvironment. However, the pathophysiologic role of this endogenous lectin in endometriosis is still uncertain. This background prompted us to study the role of Gal-1 in the pathogenesis of endometriosis, as well as, the potential therapeutic value of neutralizing the pathophysiologic processes mediated by this lectin in endometriosis. To carried out these objectives, tissue expression pattern of Gal-1 in endometriotic lesions and in eutopic endometrium from patients with

endometriosis was analyzed, the levels of protein expression of this lectin were compared between ectopic lesions and eutopic endometrium from patients affected by different degrees of severity of endometriosis, and also it was evaluated the effect of knockdown Gal-1 expression on *in vitro* proliferation of endometrial stromal cells from patients with endometriosis or controls. On the other hand, we also studied the contribution of Gal-1 to vascular development and growth of autologous and heterologous endometriotic lesions experimentally-induced in wild-type and Gal-1-deficient (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) female mice, and validated the therapeutic effects of Gal-1 blockade *in vivo* using a neutralizing anti-Gal-1 monoclonal antibody.

In this study, it was demonstrated that tissue expression of Gal-1 in endometriotic lesions and eutopic endometrium was restricted to stromal and endothelial cells and it was absent in epithelial cells. Besides, Gal-1 protein expression levels were higher in the endometriotic lesions than eutopic endometrium from patients with minimal or mild degree of endometriosis, suggesting that Gal-1 could be playing a key role in the onset and development of this pathology at early stages. There were no substantial differences in the expression levels of Gal-1 in the endometrium or peritoneal fluid from patients with endometriosis and controls. However the knockdown of Gal-1 expression had a differential functional effect *in vitro*: there was a decreased cellular proliferation rate in endometrial stromal cells from patients with endometriosis, but no significant effect was observed on cellular proliferation rate in endometrial cells from control patients, although the surface glycophenotype of these cells was equally permissive for binding of Gal-1.

In addition, by means of an experimental endometriosis model induced in wild-type and *Lgals1*<sup>-/-</sup> mice we showed that this lectin orchestrates the formation of vascular networks in endometriotic lesions *in vivo*, facilitating their ectopic growth independently of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the keratinocyte-derived CXC-motif (CXCL2-KC) cytokine. Targeted blockade of Gal-1 within mouse peritoneal cavity using a specific anti-Gal-1 neutralizing antibody reduced the size and vascularized area of endometriotic lesions.

In summary, these results highlight the pivotal role of Gal-1 in endometriosis. It was found that the presence of Gal-1 is crucial for *in vitro* proliferation of eutopic endometrial stromal cells, for the vascular development and consequent growth of endometriotic lesions *in vivo*, and it was also demonstrated that the specific blockade of Gal-1 at peritoneal level restricts the growth of endometriotic lesions, suggesting that in the future this endogenous

lectin could become in a potential therapeutic target that allows to develop new effective treatments to mitigate the progression and symptoms of this disease.

**KEY WORDS:** endometriosis, Galectin-1, pathophysiology, vascularization.

**A mis viejos**

...por darme las raíces y las alas

# AGRADECIMIENTOS

Bueno...llegamos al final!! y como no podría hacerlo de otra manera, quiero agradecerles infinitamente a todas aquellas y estas personas que han hecho de este largo camino un viaje sumamente placentero y lleno de todo tipo de aprendizajes. De cada uno de Ustedes voy a guardar por siempre un cálido recuerdo...a TODOS...1000 gracias!!!!

A **Gaby**...gracias por ser mi hoja de ruta en todo este trayecto, sin dudas gran parte del mérito por haber llegado hasta acá lo tenés vos porque siempre te preocupaste para que las cosas me salieran lo mejor posible; y con paciencia, dedicación, seriedad, responsabilidad y sobre todo: cariño y amistad, hiciste de este largo y fructífero proceso de aprendizaje y formación académica un recorrido que aún no termina y que espero nos siga llenando de satisfacciones y lindos momentos.

A **Ine**...gracias por tu inmensa calidez humana que, desde el primer día que me recibiste en el IByME, siempre se reflejó en una alegre, sincera y generosa predisposición para ayudarme en todo, por estar pendiente de que no me falte nada, que me sienta bien y que trabaje contento. Sin duda sos una de esas personas genuinamente buenas.

A mis compañeritas de Laboratorio: **Anita, Mariel, Lu y Carla**...gracias por integrarme desde el primer día (confieso que al principio pensé que por ser el único varoncito del Lab el “derecho de piso” me iba a costar carito...y por suerte no fue así!), gracias por enseñarme y ayudarme, siempre, en todas las etapas transcurridas a lo largo de estos 5 años de trabajo; y por sobre todo...gracias porque entre mates, almuerzos con charlas (muy bizarras y hasta pseudo-ginecológicas alguna de ellas) y risas, hicieron que el día a día en el laboratorio se convierta en un lugar dónde me siento muy a gusto de venir, y de saber que voy a seguir viniendo todos los días.

A **Gabriel Rabinovich**...gracias Gaby por tu amistosa, generosa e invaluable predisposición para ayudarme en todo este proceso. Más allá del merecido reconocimiento a nivel científico que has logrado en estos años, yo tengo la suerte de haber conocido a la extraordinaria persona que sos, y sin lugar a dudas tu aporte, convertido para mí en enseñanza, ha sido un pilar fundamental para cimentar y concluir este trabajo.

A **Diego Croci**...gracias Panza por haberme acompañado desde el principio y hasta el final de esta tesis, para la cual tus ideas, sugerencias y buena predisposición para ayudarme cada vez que te lo pedí (y fueron muchas veces) resultaron indispensables. Además, y como ya le dije a otra persona, vos también sos ese tipo de ser humano genuinamente bueno, y eso sumado a las charlas de nocecita cuando caías por el lab a tomar unos mates, los asados y demás momentos compartidos hicieron de vos un buen amigo mío.

A **todos los integrantes del Laboratorio de Inmunopatología**...gracias por la buena onda y generosidad con que me han ayudado siempre que fui a preguntarles o pedir algo.

Al **Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)**...gracias a todas y cada una de las personas que lo conforman por haberme brindado no sólo un lugar extraordinario para realizar mi trabajo sino también por la calidez humana de sus integrantes que en definitiva constituye la esencia que tiene este lugar.

A la **Dra. Cecilia Johnson y su equipo de trabajo**...gracias por haberme recibido, integrado, enseñado y ayudado tan gentil y profesionalmente durante los 4 meses que estuve en su laboratorio en Santiago de Chile.

A mi Consejera de Estudios: **Dra. María Fernanda Troncoso**...gracias por la muy buena predisposición para responder mis (varias) dudas en forma rápida y correcta.

A **Marin, Ari y Vani**...gracias por haberme tratado siempre con tanto cariño, simpatía y por haberme escuchado cuando tenía algo para contar y necesitaba una oreja (cosa rara en mí pero a veces me pasa). Son tres personas geniales!

A **los integrantes de mi ex-pasillo:** los Calvo, los Luthy y los Chasseing...muchísimas gracias a todos y cada uno de uds por haber compartido conmigo todo estos años de mates, almuerzos, juntadas, charlas y risas que transformaron en un placer cotidiano la jornada laboral.

A **los integrantes de mi nuevo pasillo:** los Lanaris y las Sullys...gracias por hacer que la buena onda con la que estaba acostumbrado a convivir con la gente de mi ex-pasillo también se traslade (junto con el material de laboratorio) al pasillo que habitamos ahora. Es también un gusto compartir con uds momentos de risas, bromas y por supuesto...mates.

A los Machos: **Gonza, Panza, Santi, Pela, Tomy, Sherman, Sebas DD, Lucho, Nicolino, Polaco y Luquitas**...uds me quedaron justo a la mitad de los agradecimientos, y lo hice con total intencionalidad porque son un ejemplo claro de la transición entre las personas que forman parte de mi ambiente laboral y de las personas que forman parte de mi vida personal, sin duda todos estos años de haber compartido muchos momentos lindos (y algunos un poco más difíciles) en una canchita de fútbol, tomando mates en algún pasillo o laboratorio, alrededor de un fueguito en un asado (aclaro que no fue en el IByME porque está terminantemente prohibido hacer fuego o brazas en patios y terraza ja!), en algún barcito o playita por ahí, cada uno a su manera y con su forma de ser fueron convirtiéndose en las personas con las que me gusta compartir todos esos momentos que me hacen bien y disfruto a pleno, es por eso que les agradezco inmensamente que me brindaran la oportunidad de nombrarlos justo en este lugar: el de los amigos! me pareció que es lo más justo para con uds y lo más sincero para conmigo.

A **mi familia: Norita, Aldo y Hernán**...decirles gracias sería poco...no alcanza, uds son más que un motivo de agradecimiento...son TODO para mí!, son las personas que siempre me bancaron incondicionalmente sin importar los aciertos y errores que cometí, y también estoy seguro que son las personas que lo van a seguir haciendo siempre. Son mi cable a tierra y también los que me empujan para remontar vuelo, son los que me heredaron buenos valores en vez de sólo buenas conductas, los que me muestran día a día que las cosas salen bien cuando uno se esfuerza honradamente, quiere con sinceridad en lo que cree y además actúa en consecuencia. De uds tres aprendí lo más importante: que a las

personas que te quieren tenés que valorarlas, cuidarlas, ayudarlas y estar siempre ahí cuando te necesiten, porque en definitiva esa la manera (mi manera) de hacerles sentir que los querés.

A **mi abuela Aurora**...gracias por haber sido siempre mi cómplice, mi otra mamá y la abuela más copada, malcriadora y condescendiente que pude tener. Ahora que estoy un poco más grande, y si vos en algún rinconcito de tu maravilloso ser aún pudieses entenderme, no sabés cuanto me gustaría contarte que yo al abuelo Antonio también lo extraño un montón, que lo tengo presente todos mis días como guía de sencillez y honradez, es raro y muy gratificante entender a la distancia (de años, no de metros) porque a mi abuelo lo quería todo el mundo.

A **mis tíos y primos**...gracias por formar parte de un grupo familiar unido, que aún con sus diferencias, siempre están ahí para ayudar o acompañar cuando hace falta. Y en especial a mi ahijadito Eloy, por hacerme conocer un tipo de vínculo que me llena de paz y de amor por una personita tan naturalmente inocente y ajena a las preocupaciones que tenemos los que nos creemos adultos...vos sólo me pedís que juegue y así me alegrás la vida unos instantes.

A mis amigos de ayer, de hoy y de siempre: **Alejo, Juanfran, Nacho, Gero, Lautá, Agustín, Gise, Barbarita, Mariquena, el Portu, el Cisco, Curita, Gringola, Tecla, Casco, Fercha, Sotile, Adrián, Andrés y Gerardo**...gracias por bancarme siempre, por haber sido a lo largo de todos estos años los hacedores de muchos de mis momentos de felicidad, de aprendizaje y por dar crédito que cuando alguien dice "será malo como persona pero conmigo es un buen amigo" yo puedo retrucarle que nadie puede ser un buen amigo si es malo como persona!...uds son la evidencia clara y personificada que confirma mi argumento.

# ABREVIATURAS

**17 $\beta$ -HSD:** 17-beta hidroxisteroide deshidrogenasa

**aAc:** auto-anticuerpos

**Ach:** acetilcolina

**AFS:** Sociedad Americana de Fertilidad

**AINEs:** drogas anti-inflamatorias no esteroideas

**Ang:** angiopoyetina

**ANOVA:** análisis unidireccional de varianza

**AOC:** anticonceptivos orales combinados

**ARN $sh$ :** ácido ribonucleico antisentido *short hairpin*

**ASRM:** Sociedad Americana de Medicina Reproductiva

**Bax:** ligando pro-apoptótico denominado Proteína X asociada a Bcl-2

**Bcl-2:** ligando anti-apoptótico derivado de linfoma de células B

**BSA:** albúmina sérica bovina

**CD1a:** receptor de CDi

**CD36:** receptor macrofágico de tipo "scavenger"

**CDi:** célula dendrítica inmadura

**CGRP:** péptido relacionado con el gen de la calcitonina

**COX-2:** ciclo-oxigenasa 2

**CXCL2-KC:** citoquina CXC derivada de queratinocitos

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina

**DMEM/F12:** medios de cultivo Eagle modificado por Dulbecco / F-12 de Hams

**DRC:** dominio de reconocimiento de carbohidratos

**E<sub>1</sub>:** estrona

**E<sub>2</sub>:** estradiol

**EDTA:** ácido etildiaminotetraacético

**EEM:** error estándar de la media

**EGCG:** galato de epigallocatequina

**ELISA:** ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

**ER:** receptor de estrógenos

**F8.G7:** anticuerpo monoclonal anti-Gal-1

**FasL:** ligando del receptor Fas

**FGF<sub>2</sub>:** factor de crecimiento de fibroblastos- 2

**Gal:** galectina

**GnH:** hormonas gonadotróficas

**GnRH:** factor liberador de GnH

**HIF-1 $\alpha$ :** factor inducido por hipoxia 1 alfa

**HLA-G:** antígeno leucocitario humano G

**IFM:** intensidad de fluorescencia media

**IFN- $\gamma$ :** interferón gama

**IgG:** inmunoglobulina G

**IL:** Interleuquina

**KIRs:** receptores inhibidores de los linfocitos NK

**LB:** linfocito B

***Lgals1*<sup>-/-</sup>:** ratones transgénicos que tienen deleciónado el gen de Gal-1

**LP:** líquido peritoneal

**LTctx:** linfocito T citotóxico

**LTh:** linfocito T colaborador

**LTreg:** linfocito T regulador

**MCP:** proteína quimiotáctica de monocitos

**MEC:** matriz extracelular

**MEM/D-val:** medio de cultivo de Eagle suplementado con D-valina

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**MMPs:** metaloproteasas de la matriz extracelular

**MTS:** 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio

**M $\phi$ :** macrófagos

**NGF:** factor de crecimiento neuronal

**NGFRp75:** subunidad p75 del receptor de NGF

**NGS:** suero normal de cabra

**NK:** linfocitos citotóxicos naturales

**P<sub>4</sub>:** progesterona

**PBS:** buffer fosfato salino

**PDGF-B:** factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo B

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E<sub>2</sub>

**PHA-L:** Fitohemaglutinina-L

**PPARs:** receptores de proliferación  
activados por peroxisomas

**PR:** receptor de progesterona

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**SDF-1:** factor derivado de células  
estromales 1

**SERMs:** moduladores selectivos de los  
receptores de estrógeno

**SFB:** suero fetal bovino

**sICAM-1:** fracción soluble de la molécula  
de adhesión intercelular 1

**SNA:** aglutinina de *Sambucus nigra*

**SP:** sustancia P

**TA:** temperatura ambiente

**TBS:** buffer Tris salino

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento  
transformante beta

**TH:** hidroxilasa de tirosina

**TIMPs:** inhibidores tisulares de las MMPs

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**Tr1:** linfocitos T regulatorios tipo 1

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio  
vascular

**VEGFR2:** receptor de tipo 2 de VEGF

**vWF:** factor de von Willebrand

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	4
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	8
<b>ABREVIATURAS</b> .....	12
<b>ÍNDICE</b> .....	15
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	18
<i>¿Qué es la endometriosis?</i> .....	18
<i>Prevalencia</i> .....	19
<i>Etiología</i> .....	20
<i>Sintomatología</i> .....	24
<i>Diagnóstico</i> .....	25
<i>Clasificación</i> .....	26
<i>Mecanismos fisiopatológicos</i> .....	29
<i>Vascularización de las lesiones endometriósicas</i> .....	36
<i>Terapéutica</i> .....	41
<i>Galectinas</i> .....	45
<i>Galectina-1</i> .....	48
<i>Galectina-1 en el proceso angiogénico</i> .....	49
<i>Galectina-1 en la fisiología y fisiopatología reproductiva</i> .....	50
<i>Galectina-1 y endometriosis</i> .....	51
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	53
<i>Hipótesis</i> .....	53
<i>Objetivo general</i> .....	54
<i>Objetivos específicos</i> .....	55
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	56
<b>EXPERIMENTOS CON MUESTRAS DE PACIENTES</b> .....	56
<i>Pacientes</i> .....	56
<i>Inmunofluorescencia doble e inmunohistoquímica</i> .....	57
<i>Cultivos celulares</i> .....	58
<i>Inmunocitoquímica</i> .....	59
<i>Western blot de Galectina-1</i> .....	60
<i>ELISA de Galectina-1 en los líquidos peritoneales</i> .....	61

<i>Silenciamiento transitorio de la expresión de Galectina-1 en cultivos primarios de células estromales endometriales</i> .....	61
<i>Ensayo de proliferación celular in vitro</i> .....	63
<i>Marcación de células estromales endometriales con lectinas y su análisis por citometría de flujo</i> .....	63
<b>EXPERIMENTOS CON EL MODELO MURINO DE ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL</b> .....	65
<i>Animales</i> .....	65
<i>Inducción quirúrgica de las lesiones endometriósicas</i> .....	65
<i>Bloqueo de Galectina-1 en la cavidad peritoneal</i> .....	67
<i>Evaluación macroscópica de las lesiones endometriósicas</i> .....	67
<i>Evaluación microscópica de las lesiones endometriósicas</i> .....	68
<i>Perfusión vascular para marcar los vasos sanguíneos</i> .....	68
<i>Inmunofluorescencia</i> .....	69
<i>Inmunohistoquímica</i> .....	69
<i>ELISA de VEGF-A y CXCL2-KC en el líquido peritoneal</i> .....	70
<i>Análisis estadístico</i> .....	71
<b>4. RESULTADOS</b> .....	72
<b>RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON MUESTRAS DE PACIENTES</b> .....	72
<i>Localización tisular de Galectina-1 en las lesiones endometriósicas y en el endometrio eutópico</i> .....	72
<i>Niveles de expresión proteica de Galectina-1 en biopsias de lesiones endometriósicas y de endometrio eutópico</i> .....	76
<i>Niveles de Galectina-1 en el líquido peritoneal</i> .....	79
<i>Silenciamiento transitorio de la expresión de Galectina-1 en cultivos primarios de células estromales endometriales</i> .....	80
<i>Efecto del silenciamiento de la expresión de Galectina-1 sobre la proliferación in vitro de células estromales endometriales</i> .....	81
<i>Glicofenotipo de las células estromales endometriales</i> .....	82
<b>RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL MODELO MURINO DE ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL</b> .....	85
<i>Efecto de Galectina-1 sobre el crecimiento in vivo de las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	85
<i>Efecto de Galectina-1 sobre la arquitectura histológica de las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	86
<i>Localización histológica de Galectina-1 en las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	88
<i>Localización histológica de Galectina-1 en el tejido endometrial murino</i> .....	89
<i>Galectina-1 promueve el desarrollo vascular in vivo de las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	90
<i>Análisis de los factores pro-angiogénicos VEGF y CXCL2-KC en el modelo murino de endometriosis experimental</i> .....	92
<i>Infiltración de macrófagos en las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	96
<i>Efecto del bloqueo de Galectina-1 en la cavidad peritoneal sobre el crecimiento in vivo de las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	97
<i>Efecto del bloqueo de Galectina-1 en la cavidad peritoneal sobre la arquitectura histológica y expresión tisular de esta lectina en las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	98

<i>Efecto del bloqueo de Galectina-1 en la cavidad peritoneal sobre la vascularización de las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	100
<i>Efecto del bloqueo de Galectina-1 en la cavidad peritoneal sobre los factores pro-angiogénicos VEGF y CXCL2-KC</i> .....	101
<i>Efecto del bloqueo de Galectina-1 en la cavidad peritoneal sobre la infiltración de macrófagos en las lesiones endometriósicas murinas</i> .....	104
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	106
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	119
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	121
<b>PUBLICACIONES</b> .....	144

# 1. INTRODUCCIÓN

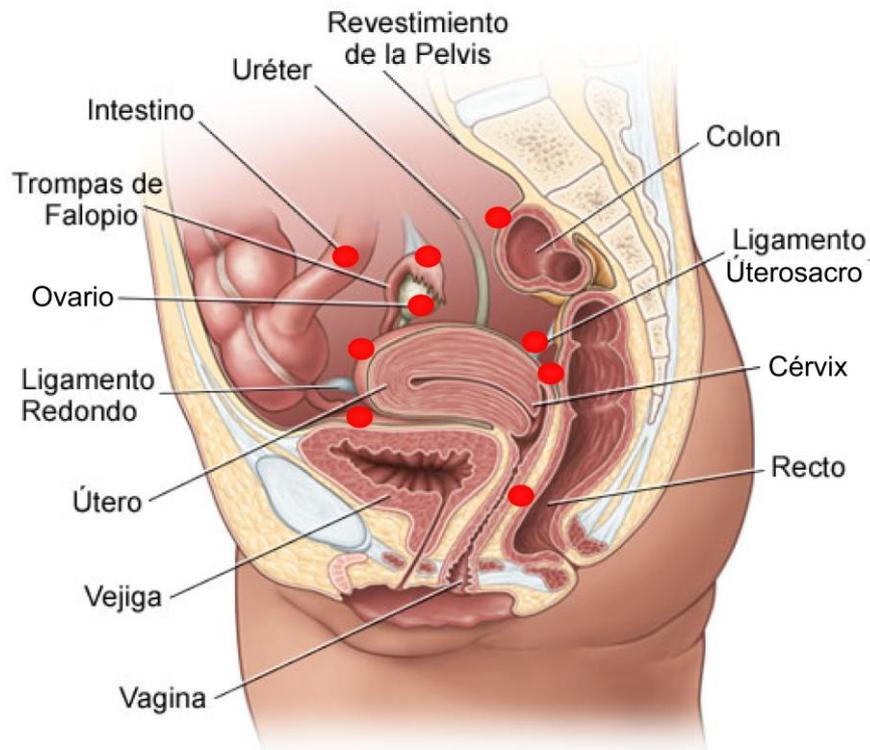
## ¿QUÉ ES LA ENDOMETRIOSIS?

---

La endometriosis es una de las patologías ginecológicas benignas más frecuentes. Se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina formando lesiones endometriósicas [1-3]. Estas lesiones pueden estar constituidas por glándulas secretoras rodeadas de estroma celular, o bien, pueden estar conformadas sólo por estroma celular que puede ser compacto o laxo de acuerdo a la naturaleza histológica de la lesión [4].

Si bien la etiopatogenia de la endometriosis es multifactorial, las lesiones endometriósicas se caracterizan por su dependencia de estrógenos para desarrollarse y prosperar en los diversos sitios ectópicos. Estas lesiones se encuentran principalmente en los ovarios, los ligamentos úterosacros, la fosa ovárica peritoneal, el peritoneo pélvico de fondo de saco, el septo rectovaginal y el espacio retroperitoneal [5,6] (**Figura 1.1**). Sin embargo, también se ha reportado la presencia de lesiones endometriósicas en sitios ectópicos poco frecuentes como la vejiga urinaria, los pulmones, la pleura, el apéndice, el recto, los intestinos, el cérvix y la vagina [7].

### Posibles Localizaciones de la Endometriosis



**Figura 1.1. Sitios ectópicos donde se establecen las lesiones endometriósicas.** Imagen modificada de: <http://www.uchospitals.edu/online-library/content=S03666>.

La presencia de las lesiones endometriósicas generalmente dan lugar a un proceso inflamatorio crónico en la cavidad peritoneal que en gran medida es responsable de los intensos, y en muchos casos inhabilitantes dolores pélvicos que sufren las pacientes. La infertilidad, es el otro síntoma importante asociado a esta enfermedad [8].

## PREVALENCIA

Si bien en nuestro país no contamos con datos estadísticos oficiales que nos permitan conocer o estimar la prevalencia de esta patología en la población femenina, en diversos estudios realizados en el ámbito internacional se ha reportado que la endometriosis afecta a

aproximadamente un 10% en la población de mujeres en edad reproductiva [9,10]. Es importante resaltar que la prevalencia de esta enfermedad puede incrementarse hasta un 40% en las mujeres que presentan problemas de infertilidad [11-13], y hasta un 50% en las mujeres que además presentan una dismenorrea moderada a severa [13]. También existen casos aislados de mujeres postmenopáusicas y niñas prepúberes con anomalías uterinas que padecen esta enfermedad [14,15].

Otro factor epidemiológico a considerar es la elevada tasa de recurrencia que presenta esta patología, que puede llegar a un 25% en los primeros 2 años e incrementarse a un 40-50% a los 5 años luego de finalizados los tratamientos [16,17].

Además, es importante mencionar que en los últimos años son cada vez más concluyentes los estudios que reportan un incremento significativo en el riesgo de desarrollar cáncer epitelial de ovario en las pacientes con endometriosis, principalmente carcinomas de tipo endometriode y de células claras [18,19].

Esta elevada prevalencia a nivel poblacional ha transformando a esta patología en un problema relevante de salud pública que debe ser considerado apropiadamente, dado que por ejemplo en Estados Unidos de América es la tercera causa de internación ginecológica en la población de mujeres adultas menores de 45 años de edad [20]. También se debe tener en cuenta que por ejemplo en los Estados Unidos de América genera un costo anual en servicios de atención médica de aproximadamente unos €49.6 billones, en Alemania de unos €12.5 billones, en el Reino Unido de unos €9.9 billones y en Francia de unos €9.5 billones [21], sólo por mencionar algunos de los países donde se realizan análisis estadísticos que permiten evaluar y poner en relevancia el costo económico asociado a la elevada prevalencia de esta enfermedad.

---

## **ETIOLOGÍA**

---

Si bien los griegos en tiempos ancestrales ya habían dejado escritos donde se hacía mención a síntomas que pueden atribuirse actualmente a esta enfermedad, la endometriosis fue descrita por primera vez como entidad patológica en el año 1860 por el patólogo austriaco Carl F. von Rokitansky [22], y a pesar del tiempo transcurrido desde

entonces, aún no se conocen completamente los mecanismos etiopatogénicos involucrados en el establecimiento y progresión de la enfermedad. Se han formulado diversas hipótesis, algunas de ellas mejor aceptadas que otras, con la intención de explicar la etiología de la endometriosis. A continuación se exponen algunas de las más importantes:

***Metaplasia celómica:*** esta fue la primera hipótesis, propuesta en 1919 por R. Meyer. Se fundamenta en el hecho que tanto el tejido endometrial como el tejido peritoneal, y las células del epitelio superficial que recubre los ovarios, se diferencian a partir de un tejido embrionario común: el epitelio celómico embrionario. En base a esto, Meyer propuso que la endometriosis se originaba a partir de la membrana celómica mediante un proceso de transformación del tejido peritoneal o del epitelio ovárico en tejido endometrial ectópico, aunque no se tiene en claro aún cuáles serían los factores que inducen dicha transformación metaplásica. Si bien actualmente esta no es la hipótesis más aceptada para explicar la formación de los diversos tipos de lesiones peritoneales, bien podría explicar la formación de las lesiones endometriósicas ováricas, también denominadas endometriomas, las cuales podrían originarse como consecuencia de la transformación metaplásica del epitelio superficial ovárico en tejido de tipo endometrial [23,24].

***Propagación vascular:*** en la década de 1920 dos médicos patólogos: J. Halban en 1924 y J.A. Sampson en 1927 [25], propusieron en forma independiente una hipótesis que intentaba explicar la aparición de focos endometriósicos en sitios distantes de la cavidad peritoneal. Si bien la endometriosis es una enfermedad benigna, en dicha hipótesis postularon que células o fragmentos endometriales viables podrían ingresar a la circulación linfática o sanguínea y de esta manera propagarse, mediante el proceso conocido como metástasis, a sitios ectópicos distantes. Si bien esta hipótesis es también cuestionada, bien podría explicar la formación de las lesiones endometriósicas en sitios anatómicos inusuales como el tórax, el cerebro o en las extremidades [24,26].

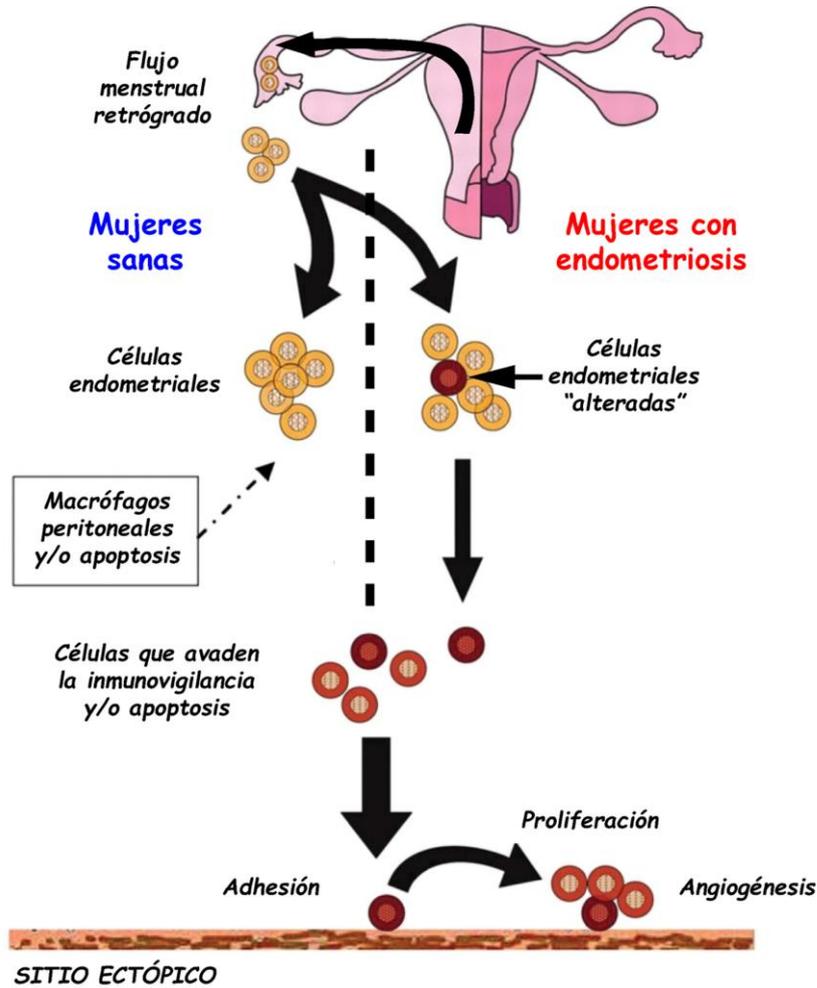
***Teoría de la implantación:*** esta hipótesis fue propuesta por J. A. Sampson en 1927 [27]. La misma postula que las lesiones endometriósicas encontradas en la cavidad peritoneal se originan como resultado del flujo de tejido menstrual en sentido retrógrado a través de las trompas de Falopio, el cual transporta y disemina fragmentos endometriales en

la cavidad peritoneal [28]. Estas células endometriales ectópicas tienen la capacidad de sobrevivir en el ambiente peritoneal, implantarse y proliferar en la superficie de diversos órganos o tejidos hasta formar una lesión endometriósica [24] (**Figura 1.2**).

Se han reportado diversas evidencias que sustentan esta hipótesis, entre las cuales las más relevantes son:

- ✓ aproximadamente el 90% de las mujeres en edad reproductiva presentan algún grado menstruación retrograda, siendo común la observación de reflujo menstrual en la cavidad peritoneal [29].
- ✓ se han encontrado células endometriales viables en el líquido peritoneal de mujeres que padecen endometriosis [30,31].
- ✓ se ha corroborado experimentalmente que las células endometriales pueden implantarse y formar lesiones endometriósicas en la cavidad peritoneal de ratones hembra inmunosuprimidos [32-34].
- ✓ se ha reportado un aumento de la incidencia de endometriosis en mujeres con obstrucciones anatómicas en las vías de salida del flujo menstrual [35,36].

Si bien esta es la hipótesis mejor aceptada para explicar el establecimiento de lesiones endometriósicas en la cavidad peritoneal, es importante resaltar que el reflujo de tejido menstrual en sentido retrógrado es un fenómeno fisiológico normal en la mayoría de las mujeres, y sólo un 10% de las mismas desarrolla endometriosis, por lo tanto el sólo hecho de que el tejido endometrial se encuentre presente en la cavidad peritoneal no es suficiente para que una mujer desarrolle la enfermedad. Actualmente se sabe que los mecanismos etiopatogénicos de la endometriosis son muy complejos e involucran distintos procesos que se interrelacionan y coexisten en la cavidad peritoneal, como ser: factores y condiciones de naturaleza hormonal e inmunológica, que sumados a las características intrínsecas del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis les permiten a las células endometriales ectópicas evadir los sistemas de inmunovigilancia y sobrevivir en la cavidad peritoneal, para luego implantarse en un tejido u órgano en el cual logran proliferar hasta convertirse en una lesión endometriósica que desarrolla sus propia vasculatura para autosustentarse [37,38] (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2. Mecanismo propuesto para explicar la etiología de la endometriosis peritoneal.**

Imagen modificada de: "The search for genes contributing to endometriosis risk". G. W. Montgomery y col. *Human Reproduction Update* 2008 [39].

**Células madres progenitoras:** es la hipótesis más reciente dado que se postuló a mediados de la década pasada. En ella se considera el hecho de que el endometrio humano es un tejido dinámico, el cual se somete a ciclos de crecimiento y regresión con cada fase menstrual. Las células madre progenitoras presentes en el útero son probablemente las responsables de esta notable capacidad regenerativa [40]. Pero también estas mismas células podrían originar lesiones endometriósicas si son diseminadas en la cavidad peritoneal mediante el flujo menstrual retrógrado [41]. Recientemente se publicó un estudio que aporta evidencia crucial para sustentar esta hipótesis, dado que en el mismo se ha

corroborado la presencia de células madres endometriales en muestras de sangre menstrual de pacientes con endometriosis [42].

Pero no sólo las células madres progenitoras que residen en el útero pueden dar lugar a la formación de lesiones endometriósicas, ya que también se ha postulado que las células madres mesenquimales pueden trasladarse por el torrente sanguíneo desde otros tejidos tales como la médula ósea, y bajo determinados estímulos tendrían el potencial de reprogramarse y diferenciarse en células endometriales ectópicas que dan lugar a la formación de las lesiones endometriósicas, ya sea en la cavidad peritoneal como así también en sitios ectópicos inusuales [43,44].

## **SINTOMATOLOGÍA**

---

Si bien se conocen casos de pacientes asintomáticas, los principales síntomas comúnmente asociados a la endometriosis son el dolor pélvico y la infertilidad [13,45].

El dolor pélvico que afecta generalmente de un 50 a 65% de las pacientes con endometriosis [45], puede manifestarse en forma de dismenorrea (dolor menstrual atípico), dispareunia (dolor durante las relaciones sexuales) o bien como un dolor crónico que puede ser moderado o severo. Algunas pacientes, si las lesiones se ubican sobre la vejiga o sobre el recto, pueden tener episodios de disuria o proctalgia respectivamente [46]. Cualquiera sea la forma en que el dolor asociado a la endometriosis se manifieste, interfiere sin duda alguna en el desempeño social de las mujeres afectadas, como así también en su sexualidad y bienestar psicológico, menoscabando sustancialmente su calidad de vida [47,48]. El dolor pélvico intenso es muchas veces motivo de consulta de las pacientes que buscan aliviar su padecimiento, pero lamentablemente también se debe mencionar que debido a criterios equivocados o a desconocimiento por parte de algunas mujeres, como así también por parte de algunos médicos ginecólogos, es aceptado que el dolor pélvico intenso previo o durante el periodo menstrual es un evento normal. Esta situación retrasa la consulta, evita el estudio de sus causas y por consiguiente el diagnóstico de la enfermedad, dando lugar a que la endometriosis sea con frecuencia una patología subdiagnosticada.

Otro de los principales síntomas asociados a la endometriosis es la infertilidad, llegando a afectar aproximadamente al 50% de las pacientes [8,49]. Los mecanismos fisiopatológicos responsables de que la mitad de las mujeres con endometriosis sean infértiles [50], o bien presenten una capacidad de concebir significativamente reducida, no se conocen aún con certeza pero desde hace mucho tiempo son el blanco de una activa tarea de investigación científica orientada a contrarrestarlos. Algunas de las causas propuestas para explicar el origen de la infertilidad en las pacientes con endometriosis son:

- ✓ la presencia de adherencias que causan distorsiones anatómicas y/o impedimentos mecánicos que imposibilitan la correcta fertilización del ovocito [51].
- ✓ alteraciones inmunológicas, como el incremento en número y estado de activación de los macrófagos peritoneales, lo cual resulta en un aumento de la condición inflamatoria a nivel local que altera la función espermática o la supervivencia embrionaria [52,53].
- ✓ defectos endometriales que provocarían fallas en la implantación y/o defectos en la calidad ovocitaria de las pacientes con endometriosis [54,55].

Asimismo, la calidad de vida de las pacientes que sufren esta enfermedad muchas veces se ve afectada debido al hecho que deben someterse a tratamientos de fertilización asistida largos e invasivos, los cuales no siempre resultan realmente efectivos [56].

## **DIAGNÓSTICO**

---

En lo que respecta al diagnóstico de esta patología, el mismo resulta ser un tanto complejo debido a la naturaleza no específica de los síntomas, dado que por ejemplo la ocurrencia de dolores pélvicos o la infertilidad también suelen ser frecuentes en mujeres que no padecen endometriosis. Estos síntomas pueden ser compartidos con otras patologías, como por ejemplo el síndrome inflamatorio pélvico o el síndrome de intestino irritable [57,58].

Hasta el momento, el único diagnóstico certero se basa en la visualización directa de las lesiones endometriósicas mediante una cirugía translaparoscópica o laparotómica y el

posterior examen anatómico-patológico de las biopsias para confirmar su entidad. Lamentablemente, no existe en la actualidad un método de diagnóstico certero y no invasivo, es por eso que para confirmar la presencia de la enfermedad es necesario extraer y evaluar histológicamente los implantes endometriósicos [59].

Tampoco el diagnóstico por imágenes, ya sea por medio de ecografía, ultrasonografía transvaginal, tomografía computada o resonancia magnética nuclear (RMN), es del todo completo o certero. Si bien algunas formas de lesiones como por ejemplo los endometriomas suelen observarse mediante RMN o ecografía, o bien lesiones retroperitoneales o del ligamento úterosacro por ultrasonografía transvaginal, también se han reportado casos de pacientes con estos mismos tipos de lesiones las cuales no se detectaron al utilizar estos métodos de diagnóstico por imágenes en los estudios previos a la intervención laparoscópica [58,60].

El hecho de que sea necesario recurrir a un método invasivo para lograr un diagnóstico certero de la endometriosis, ha embarcado a los investigadores en una intensa búsqueda de una metodología de evaluación alternativa a la intervención quirúrgica, como por ejemplo a través de la valoración de marcadores moleculares en plasma sanguíneo [61-63]. Sin embargo, hasta el momento estas técnicas de diagnóstico no invasivo no se han estandarizado.

## **CLASIFICACIÓN**

---

La clasificación clásica de la endometriosis fue establecida por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM por sus siglas en inglés), y plantea una categorización de la enfermedad en 4 estadios.

En el año 1979 la Sociedad Americana de Fertilidad (AFS), luego devenida en la ASRM, determinó el criterio para la clasificación de la endometriosis. La última actualización de esta sistematización se realizó en el año 1996 [64]. Según esta clasificación, al momento de la cirugía laparoscópica, se debe realizar una evaluación de la localización, tipo, tamaño y número de las lesiones endometriósicas, como así también de las adherencias causadas por las mismas. En base a estos datos, se ha establecido un sistema de puntuación que pondera

el grado de severidad de la enfermedad. De acuerdo a los parámetros propuestos por esta clasificación, la enfermedad se puede presentar en cuatro estadios: estadio I o endometriosis mínima; estadio II o endometriosis leve; estadio III o endometriosis moderada, y estadio IV o endometriosis severa.

En la **Figura 1.3** se presenta un esquema donde se describen y ejemplifican las principales características a evaluar por el médico al momento de clasificar la severidad de la enfermedad.

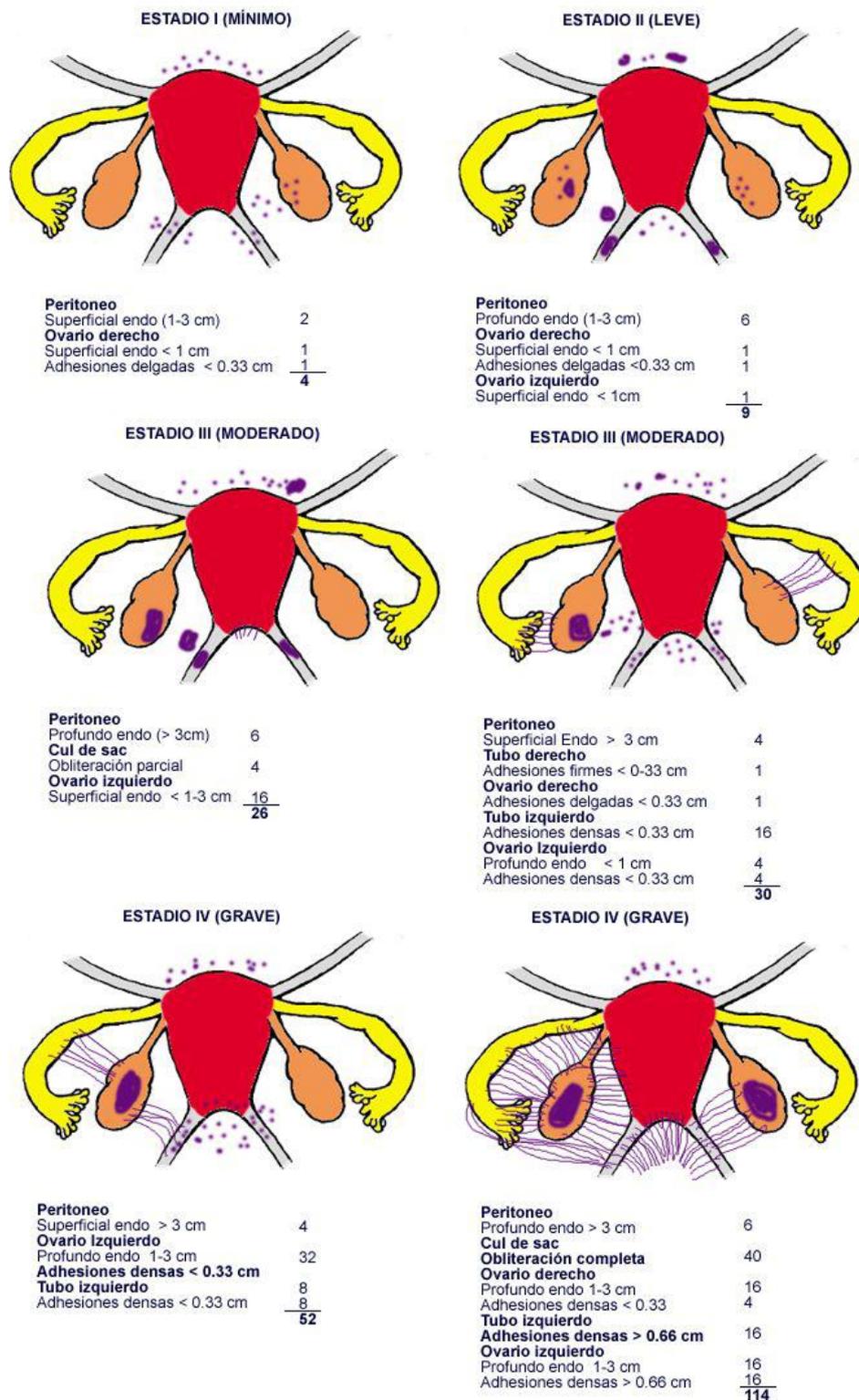


Figura 1.3. Parámetros establecidos por la ASRM para clasificar la endometriosis. Imagen tomada de: <http://www.iqb.es/ginecologia/atlas/utero/endometriosis/endometriosis04.htm>.

Si bien este sistema definido por la ASRM sigue siendo en la actualidad el más utilizado en todo el mundo para clasificar el grado de severidad de la enfermedad, el mismo presenta ciertas limitaciones, como por ejemplo el hecho de que no toma en cuenta las estructuras anatómicas retroperitoneales que presentan endometriosis infiltrante profunda [65,66], y además la clasificación de la ASRM tiene una baja capacidad de predicción de la tasa de embarazo posterior al tratamiento quirúrgico de la endometriosis [67]. Estas limitaciones han generado un intenso debate en la última década a partir del cual se han propuesto otros sistemas de clasificación que tengan en cuenta estas limitaciones y complementen satisfactoriamente el sistema definido por la ASRM [68,69].

## ***MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS***

---

Si bien es un hecho conocido que aproximadamente el 90% de las mujeres en edad reproductiva presentan cierto grado de menstruación retrograda, también es igualmente cierto que la mayoría de ellas no padecen de endometriosis [29,70]. Con el pasar de los años, se ha planteado y corroborado la existencia de diversos factores fisiopatológicos involucrados en la etiopatogenia multifactorial que caracteriza a esta enfermedad. Estos factores contribuyen sustancialmente a que los fragmentos de tejido endometrial diseminados en la cavidad peritoneal, sobrevivan, se implanten, invadan el peritoneo y proliferen hasta formar la lesión endometriósica [71,72].

En la actualidad, sabemos que las mujeres que padecen de endometriosis presentan características diferenciales en el endometrio eutópico [73,74], que sumadas a las alteraciones inmunológicas a nivel peritoneal, favorecen el establecimiento y crecimiento de las lesiones endometriósicas [52,75]. Es por ello que desde hace varios años, el estudio del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis ha intentado arrojar luz sobre algunas de las características genéticas, bioquímicas y funcionales de sus células, las cuales les permiten sobrevivir en la cavidad peritoneal evitando la muerte celular, evadir al sistema inmune, adherirse en un sitio ectópico, invadir y proliferar hasta conformar la lesión endometriósica [76,77].

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de distintos tejidos en organismos multicelulares [78,79]. El proceso de apoptosis también está involucrado en el ciclo menstrual eliminando las células senescentes de la capa funcional del endometrio durante la fase secretoria tardía y en la fase menstrual [80]. Diversos estudios han demostrado que las pacientes con endometriosis poseen índices de apoptosis disminuidos en el tejido endometrial eutópico [81-84], que se acompaña por un aumento significativo en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y una consecuente disminución de su contraparte pro-apoptótica: Bax, en el endometrio de las pacientes con endometriosis comparado al grupo control [85,86]. Asimismo, también se ha reportado un incremento de la muerte celular programada mediada por el sistema pro-apoptótico Fas - Fas ligando (FasL) en cultivos primarios de células epiteliales endometriales eutópicas provenientes de pacientes con endometriosis [87]. Estos trabajos sugieren la existencia de una predisposición de las células endometriales eutópicas a ser resistentes a la apoptosis, lo cual podría tener importantes consecuencias en la supervivencia del tejido endometrial ectópico en la cavidad peritoneal [88-91].

Desde hace varios años se ha demostrado claramente que el sistema inmunológico se encuentra sustancialmente involucrado en la fisiopatología de esta enfermedad [92-95]. Prueba de ello, es que las pacientes con endometriosis presentan alteraciones en diversos componentes del sistema inmune a nivel peritoneal. Estas alteraciones vienen siendo materia de un intenso debate para esclarecer si las mismas forman parte de las condiciones causales de la enfermedad o si se producen como consecuencia de la presencia de tejido endometrial en un sitio ectópico.

Las células endometriales provenientes del reflujo menstrual no son eliminadas de manera eficiente en la cavidad peritoneal. Esta deficiencia se origina como consecuencia de la incapacidad de determinadas células inmunológicas para responder frente a los antígenos endometriales, ya sea porque se reduce o “enmascara” la expresión de estos antígenos en la superficie celular, o bien porque el reflujo menstrual es tan abundante que supera la capacidad funcional de las células inmunológicas peritoneales [96,97].

Los macrófagos constituyen la población de células inmunológicas presente en mayor número en el líquido peritoneal y en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis [98-100]. Además, los macrófagos tisulares que se encuentran infiltrando las lesiones endometriósicas muestran un incremento de su capacidad secretora liberando en la

cavidad peritoneal una serie de factores inmunomoduladores como el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la Prostaglandina  $E_2$  (PGE $_2$ ), además de citoquinas pro-inflamatorias como Interleuquina (IL)-6, IL-1 $\beta$  y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) [101,102]. Estos factores promueven la adhesión de las células endometriales al peritoneo, la invasión del tejido ectópico y su proliferación, resultando de vital importancia en el proceso etiopatogénico de la enfermedad [103]. Estas células inmunológicas son reclutadas al sitio ectópico donde se establece la lesión, mediante la acción de factores quimiotácticos, como la Proteína Quimiotáctica de Monocitos (MCP-1) secretada por las células endometrióticas y por los macrófagos activados [104,105]. Sin embargo, aunque su capacidad secretora se encuentre incrementada, la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales se encuentra seriamente limitada dado que algunos de los receptores de membrana que tienen a su cargo dicha función, como por ejemplo el receptor “scavenger” CD36, ven reducida su expresión de manera significativa, con la consecuente deficiencia en el reconocimiento y eliminación de las células endometriales ectópicas [106,107].

Asimismo, se han reportado defectos funcionales en la población de células citotóxicas naturales (NK, natural killer en inglés) provenientes de pacientes con endometriosis [108]. Las células NK son linfocitos citotóxicos efectores que pueden reconocer e inducir la lisis de células deletéreas [109,110]. Si bien aún no se conocen completamente los mecanismos involucrados en la disminución en la funcionalidad de las células NK, algunos autores postulan que esta anormalidad se produce como resultado de un estímulo antigénico prolongado, como es el caso del tejido endometrial implantado en un sitio ectópico [111], y que involucra a un grupo de receptores denominados Receptores Inhibidores de las Células NK (KIRs). Estos receptores reconocen los antígenos presentados por el Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I), e inhiben la citotoxicidad de las células NK contra las células diana que expresan antígenos en el contexto MHC-I. Consecuentemente, se ha reportado que la expresión de KIRs en las células NK peritoneales de mujeres con endometriosis se ve incrementada en relación a mujeres controles [112]. Otros autores consideran que la disminución en la funcionalidad de las células NK se debe a factores inmunomoduladores presentes en el líquido peritoneal secretados por los macrófagos o las células endometrióticas, como el TGF- $\beta$  y la PGE $_2$ , o la fracción soluble de la Molécula de Adhesión Intercelular 1 (sICAM-1), los cuales inhiben la actividad citotóxica de las células NK [113].

También la respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T citotóxicos, colaboradores y reguladores, además de los linfocitos B, tiene un papel importante en la fisiopatología de la endometriosis [114]. Se ha reportado que la citotoxicidad de los linfocitos T contra las células endometriales autólogas se reduce significativamente en las mujeres con endometriosis en relación al grupo de mujeres control [92,96,115], y uno de los probables mecanismos involucrados en este fenómeno de escape inmunológico se basa en la expresión del ligando pro-apoptótico FasL por parte de las células endometrióticas, el cual al unirse a su receptor Fas expresado por los linfocitos T citotóxicos induce la muerte por apoptosis de los mismos [116].

En otro sentido, varios autores han centrado su estudio en el balance de los niveles entre las citoquinas de tipo Th1 y las de tipo Th2 producidas por los linfocitos T colaboradores. Controversialmente, diversos trabajos han reportado que en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, tanto la concentración de citoquinas pro-inflamatorias Th1 como el Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2, y de citoquinas anti-inflamatorias Th2 como IL-4 e IL-10, se encuentran incrementadas en comparación con su concentración en el líquido peritoneal de mujeres controles [117-119]. Las citoquinas Th1 son bien conocidas por promover la activación de la respuesta inmune mediada por células, mientras que por otra parte, las citoquinas Th2 tienen como función principal estimular la inmunidad mediada por anticuerpos promoviendo la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas [115,120]. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto el papel de los linfocitos T colaboradores Th17, que secretan elevados niveles de IL-17A e IL-17F, las cuales tienen un rol importante durante el progreso de la endometriosis al estimular la expresión de otros mediadores pro-inflamatorios como IL-8, y también de PGE<sub>2</sub> como resultado de incrementar la expresión de la principal enzima responsable de su síntesis: la Ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) [121-123]. Asimismo, se ha reportado la presencia de linfocitos T reguladores en las lesiones endometrióticas [124]. Esta población de linfocitos libera factores anti-inflamatorios como IL-10 y TGF- $\beta$ , los cuales inactivan células inmunológicas fagocíticas y citotóxicas permitiéndole al tejido endometriótico evadir la respuesta inmune [125,126].

Por otra parte, se ha reportado un incremento del número de células B activadas CD20<sup>+</sup> en las lesiones endometrióticas, las cuales podrían ser las responsables de la producción de los auto-anticuerpos detectados en esta patología [114,127].

Asimismo, es importante mencionar que las células dendríticas (CDs) que infiltran las lesiones endometriósicas presentan un fenotipo inmaduro caracterizado por la elevada expresión de CD1a y la baja expresión del CMH clase II [128,129], las cuales a diferencia de las CDs maduras, no tienen la capacidad de activar a los linfocitos T citotóxicos y colaboradores Th1 o Th17, sino que cumplen una función inmunomoduladora activando a los linfocitos T reguladores para que secreten IL-10 y así promover la formación de un microambiente inmunosupresor que podría estar involucrado en la fisiopatología de la endometriosis [130,131].

Una vez que las células endometriósicas consiguen evadir la respuesta inmune en la cavidad peritoneal y contrarrestar los mecanismos de apoptosis, deben activar mecanismos celulares que les permitan establecer interacciones célula-célula y con la matriz extracelular (MEC) para adherirse e invadir el tejido peritoneal y conformar las lesiones endometriósicas. Uno de los principales mecanismos de adherencia consiste en incrementar la expresión de moléculas de adhesión celular como ICAM-1, integrina  $\beta$ 1, cadherina-E y lectinas; estas moléculas interactúan con componentes de la MEC como colágeno tipo-IV, laminina, vitronectina y fibronectina [72,132]. Conjuntamente, se ha reportado que en las mujeres con endometriosis diversos factores pro-inflamatorios como IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  incrementan la expresión y la actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), principalmente de las isoformas 2 y 9, las cuales desempeñan un rol decisivo al degradar la MEC [133,134]; sumado a esto los linfocitos T regulatorios reducen la expresión del Inhibidor Tisular de las MMPs (TIMPs) [125,134], orquestándose de esta manera un mecanismo que le permite a las células endometriósicas invadir el tejido peritoneal [72].

Una vez establecidas en el sitio ectópico, las células endometriósicas deben activar mecanismos que les permitan proliferar y subsistir en la cavidad peritoneal. El principal mecanismo de crecimiento es mediado por las hormonas esteroides, las cuales tienen un rol imprescindible en la patogénesis de la endometriosis [71,135]. Dentro de las hormonas esteroides, los estrógenos son esenciales para el crecimiento y subsistencia de las lesiones endometriósicas en el sitio ectópico [136,137]. En ese sentido, uno de los hallazgos más relevantes en pacientes con endometriosis ha sido el incremento en la expresión de la Aromatasa P450, enzima responsable de la conversión de los andrógenos a estrona en el tejido endometrial eutópico y más aún en las lesiones endometriósicas [138], donde

finalmente la estrona es convertida a estradiol por la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17 $\beta$ -HSD-1) [139-142].

Por otro lado, está ampliamente aceptado que la progesterona contrarresta el efecto proliferativo que ejerce el estradiol en el endometrio secretor normal [143], dado que induce la expresión de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (17 $\beta$ -HSD-2), la cual convierte el estradiol en estrona, que es un estrógeno menos potente [136]. Sin embargo, se ha comprobado que en las lesiones endometriósicas la expresión de los genes diana regulados por la progesterona, como el de la enzima 17 $\beta$ -HSD-2, se encuentra sensiblemente reducida dado que la presencia de los receptores de progesterona en las células endometriósicas es prácticamente inexistente, y como consecuencia de esto se incrementan los niveles de producción de estradiol en las lesiones endometriósicas [71,144].

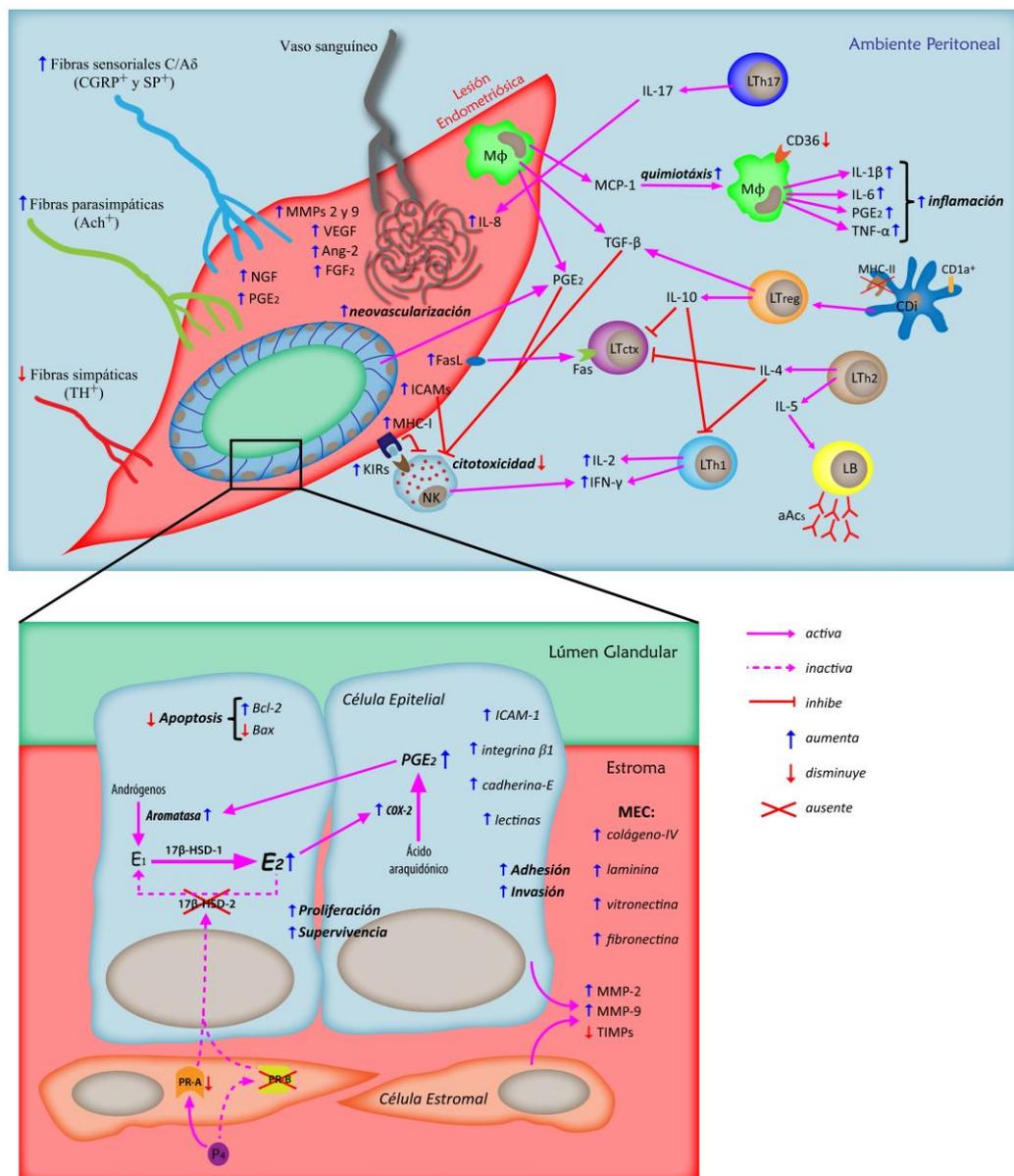
Además, se ha reportado que los estrógenos estimulan la expresión y actividad de COX-2, y en consecuencia la síntesis de PGE<sub>2</sub>, siendo este último uno de los factores pro-inflamatorios característico de esa enfermedad [145,146]. Por lo tanto se ha propuesto que la producción de estradiol en el tejido endometriósico induce un proceso de retro-alimentación positiva dado que incrementa la transcripción de COX-2, la consecuente síntesis de PGE<sub>2</sub>, y este último factor a su vez aumenta la expresión de la aromatasa P450 con lo cual se mantienen los elevados niveles locales de estradiol, promoviéndose así el crecimiento y supervivencia de las lesiones endometriósicas en el sitio ectópico [135,147,148].

Considerando que el intenso dolor pélvico es uno de los síntomas principales asociados a la endometriosis, se han realizado estudios a partir de los cuales se ha demostrado que la inervación neuronal de las lesiones endometriósicas tiene un papel relevante en la fisiopatología de esta enfermedad [149,150]. El número de fibras nerviosas identificadas en las lesiones endometriósicas es sustancialmente mayor que el observado en el tejido peritoneal de mujeres sanas [151,152]. En relación a la naturaleza de las fibras nerviosas que inervan las lesiones y los factores neurales involucrados, se ha observado un incremento de fibras sensoriales C y A $\delta$  positivas para el Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP<sup>+</sup>) y la Sustancia P (SP<sup>+</sup>), además de fibras parasimpáticas positivas para Acetilcolina (ACh<sup>+</sup>), y una disminución de las fibras del sistema nervioso simpático positivas para la Hidroxilasa de Tirosina (TH<sup>+</sup>) [152]. Asimismo, el dolor relacionado con la endometriosis que típicamente se lo asocia a los niveles elevados de PGE<sub>2</sub>, también podría

ser causado por diversos agentes neuroactivos pro-inflamatorios como el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) que sensibiliza los terminales de las fibras nerviosas sensoriales. Curiosamente, se demostró en las lesiones endometriósicas una intensa inmunorreactividad para NGF y su receptor NGFRp75 [153,154].

Finalmente, la vascularización de las lesiones endometriósicas también tiene un rol crucial en la fisiopatología de la enfermedad, pero los mecanismos, factores y evidencias experimentales que sustentan esta afirmación se explican con mayor detalle en el apartado siguiente.

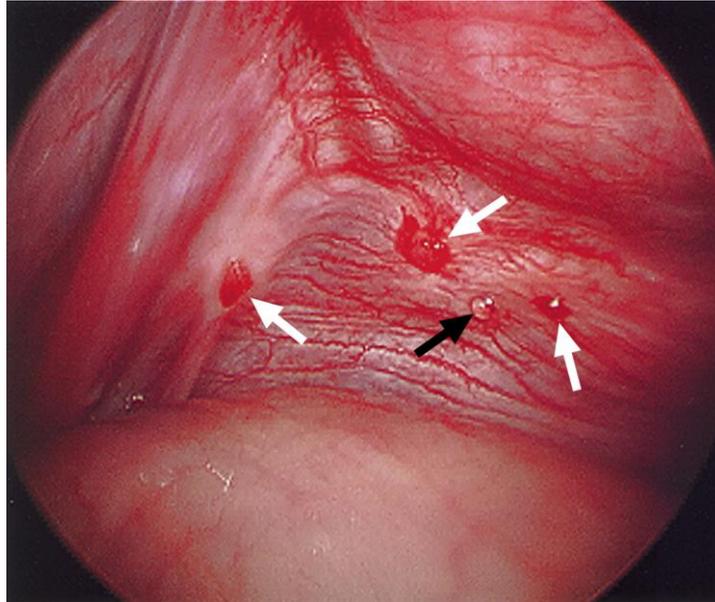
En la **Figura 1.4** se representan los mecanismos fisiopatológicos más importantes, y sus interacciones, involucrados el establecimiento y desarrollo de la enfermedad.



**Figura 1.4. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas.** Representación esquemática de los mecanismos, células y factores involucrados en la fisiopatología del desarrollo de la lesión endometriósica y su interrelación con el ambiente peritoneal (panel superior). Detalle de los mecanismos fisiopatológicos que tiene lugar en célula epitelial endometriósica (panel inferior). *CGRP*: péptido relacionado con el gen de la calcitonina, *SP*: sustancia P, *Ach*: acetilcolina, *TH*: hidroxilasa de tirosina, *NGF*: factor de crecimiento nervioso, *PGE<sub>2</sub>*: prostaglandina E<sub>2</sub>, *MMPs*: metaloproteinasas de la matriz, *VEGF*: factor de crecimiento del endotelio vascular, *FGF<sub>2</sub>*: factor de crecimiento de fibroblastos, *Ang-2*: angiopoyetina-2, *IL*: interleuquina, *Mφ*: macrófagos, *FasL*: ligando del receptor Fas, *ICAM*: molécula de adhesión intercelular, *MHC*: complejo principal de histocompatibilidad, *NK*: células asesinas naturales, *KIR*: receptor inhibidor de células asesinas naturales, *IFN-γ*: interferón-gama, *TGF-β*: factor de crecimiento transformante-beta, *TNF-α*: factor de necrosis tumoral-alfa, *MCP-1*: proteína quimiotáctica de monocitos, *CD36*: receptor macrofágico tipo “scavenger”, *aAc*: auto-anticuerpos, *CDi*: célula dendrítica inmadura, *CD1a*: receptor de célula dendrítica inmadura, *LTctx*: linfocito T citotóxico, *LTh*: linfocito T colaborador, *LTreg*: linfocito T regulador, *LB*: linfocito B, *Bcl-2*: ligando anti-apoptótico derivado de linfoma de células B, *Bax*: ligando pro-apoptótico denominado Proteína X asociada a Bcl-2, *MEC*: matriz extracelular, *TIMPs*: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz, *COX-2*: ciclo-oxigenasa 2, *P<sub>4</sub>*: progesterona, *PR*: receptor de progesterona, *E<sub>2</sub>*: estradiol, *E<sub>1</sub>*: estrona, *17β-HSD*: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

## **VASCULARIZACIÓN DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS**

Dentro de los mecanismos fisiopatológicos comprendidos en una patología de origen multifactorial como es la endometriosis, la formación de una red vascular funcional es un proceso esencial para la supervivencia y el desarrollo de las lesiones en los sitios ectópicos. Esto se ve corroborado por el hecho de que las lesiones endometriósicas metabólicamente activas se encuentran densamente vascularizadas (**Figura 1.5**) [2,155,156].



**Figura 1.5. Lesiones endometriósicas vascularizadas.** Las flechas blancas rellenas señalan las lesiones vascularizadas que presentan focos hemorrágicos localizadas en la región posterior del Ligamento Ancho, y la flecha negra señala una lesión sin vascularizar ubicada en el mismo sitio anatómico. Imagen modificada de: “Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis”. R. O. Burney y L. Giudice. *Fertility & Sterility* 2012 [2].

Si bien está ampliamente aceptado que la angiogénesis es el mecanismo principal involucrado en la vascularización de las lesiones endometriósicas, recientemente se ha propuesto, y sustentado con sólidas evidencias experimentales, que la vascularización de las lesiones se lleva a cabo a partir de dos mecanismos que actúan en forma combinada, uno de ellos es la angiogénesis y el otro la vasculogénesis post-natal [157].

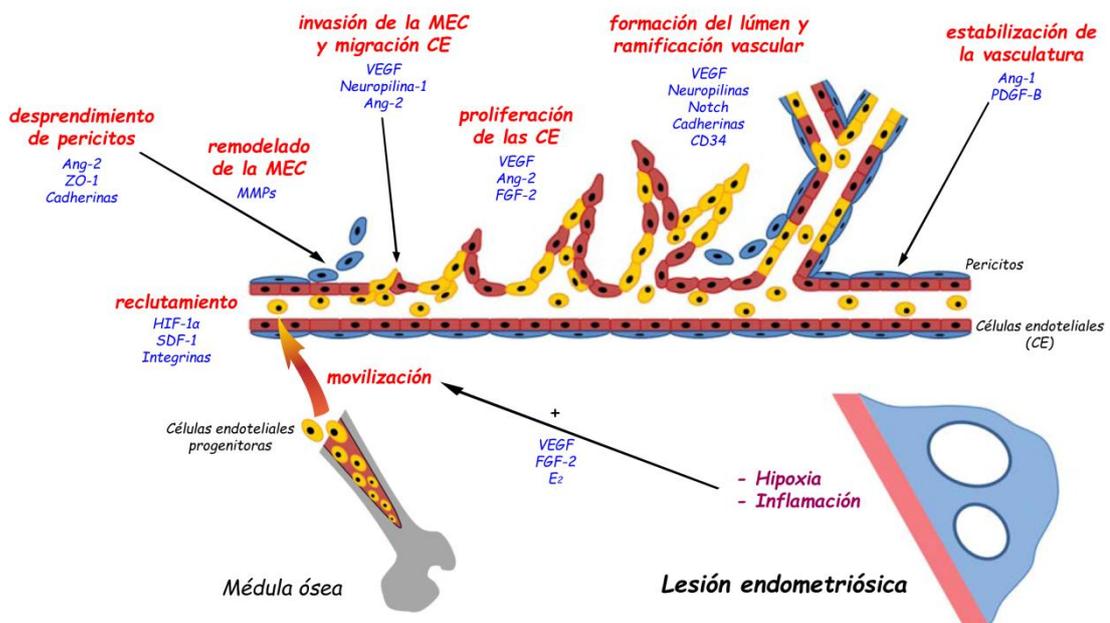
La angiogénesis se define como el proceso biológico mediante el cual un determinado tejido, normal o patológico, consigue establecer nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes, de manera que los nuevos vasos le posibiliten al tejido en cuestión obtener los nutrientes y el oxígeno necesario para su crecimiento y/o supervivencia [158,159].

El otro de los mecanismos importantes que se encuentra involucrado en la formación de vasos sanguíneos es el proceso conocido como vasculogénesis, mediante el cual se originan vasos sanguíneos *de novo* durante el desarrollo embriológico a partir de células

endoteliales progenitoras (angioblastos) procedentes de la médula ósea. En estudios recientes se ha reportado que este proceso no sólo sucede durante la etapa embrionaria sino que también se lleva a cabo en la etapa post-natal contribuyendo, en forma asociada al proceso de angiogénesis, a la formación de nuevos vasos sanguíneos en condiciones patológicas como cáncer, diabetes mellitus y endometriosis [157,160,161].

Como ya se mencionó anteriormente, los fragmentos y/o células endometriales que se diseminan en la cavidad peritoneal como consecuencia de flujo retrógrado del tejido menstrual a través de las trompas de Falopio, pueden implantarse en un sitio ectópico [28]. Pero en esta instancia inicial el tejido endometrial ectópico no cuenta con una red vascular asociada que le permita obtener nutrientes y oxígeno, por lo tanto se produce una condición de hipoxia en el seno de la lesión incipiente, que sumada a la condición inflamatoria de la cavidad peritoneal, resulta de primordial importancia para gatillar el proceso angiogénico. En esta instancia, las células endometriales ectópicas comienzan a expresar factores de crecimiento como el Factor Inducido por Hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), el Factor Derivado de Células Estromales (SDF-1),  $17\text{-}\beta$  estradiol ( $E_2$ ), el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF-2), los cuales son cruciales para promover la movilización de células endoteliales progenitoras desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo y su posterior reclutamiento en los vasos sanguíneos adyacentes a la lesión endometriósica. Estas células endoteliales progenitoras, y las células endometriales ectópicas, tienen la capacidad de promover el proceso de angiogénesis al liberar factores como la Angiopoyetina-2 (Ang-2), además de inhibir proteínas de unión intercelular como ZO-1 y cadherinas, para favorecer el desprendimiento de las células perivasculares: pericitos y células de la musculatura lisa vascular, las cuales recubren los vasos sanguíneos del tejido adyacente al sitio de implantación de los fragmentos o células endometriales ectópicas. Además, tanto las células endoteliales progenitoras, como las células endometriales ectópicas, secretan factores pro-angiogénicos como VEGF, FGF-2, Ang-2 y Neuropilina-1 para promover la activación de las células endoteliales residentes que se encuentran conformando los vasos sanguíneos del tejido u órgano peritoneal afectado para que éstas últimas liberen enzimas, como las MMPs, que degradan la MEC permitiendo que las células endoteliales residentes como así también las progenitoras, comiencen a invadir el tejido adyacente y proliferar hasta formar el tubo endotelial, el cual al ir extendiéndose también se va ramificando. Una vez que estos nuevos vasos sanguíneos penetran y se establecen en la

lesión endometriósica, las células endoteliales liberan factores como Angiopoyetina-1 (Ang-1) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas tipo B (PDGF-B) para reclutar células peri-endoteliales, las cuales recubren y estabilizan dichos vasos confiriéndoles madurez funcional (**Figura 1.6**). Mediante estos mecanismos asociados de angiogénesis y vasculogénesis post-natal, las lesiones endometriósicas consiguen sobrevivir y nutrirse de los factores de crecimiento que les permiten impulsar su desarrollo [157,162].



**Figura 1.6. Mecanismos implicados en la formación de los vasos sanguíneos en las lesiones endometriósicas.** Imagen modificada de: “Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle”. M. W. Laschke y col. *Human Reproduction Update* 2011 [157].

Este modelo de vascularización de las lesiones endometriósicas se sustenta en trabajos en los que se ha reportado que algunos de los factores pro-angiogénicos mencionados, y sus correspondientes receptores, se encuentran presentes en el líquido peritoneal y/o en el tejido endometrial ectópico de mujeres con endometriosis [163].

Se ha demostrado convincentemente que el VEGF está implicado en la fisiopatología de la endometriosis [164,165], dado que su expresión se incrementa significativamente en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y dicho incremento es mayor aún en

las lesiones endometriósicas; además su concentración en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis está aumentada con respecto al líquido peritoneal de mujeres controles [166-168]. Por otro lado, en trabajos realizados en modelos de endometriosis inducida experimentalmente en ratones, se observó que cuando se bloquea la función biológica de VEGF con compuestos análogos o por medio de un anticuerpo neutralizante, se produce una disminución significativa en el número de lesiones endometriósicas desarrolladas [169,170], poniendo de manifiesto la importancia de este factor pro-angiogénico en la fisiopatología de la endometriosis.

También las angiopoyetinas son importantes factores de crecimiento del endotelio vascular cuya función principal es promover la maduración y remodelación de los vasos sanguíneos [171]. Se ha demostrado que tanto Ang-1 y Ang-2 incrementan su expresión en cultivos de explantos de lesiones endometriósicas [172].

Como ya se explicó, una de las principales características de la endometriosis es su naturaleza inflamatoria, motivo por el cual se ha reportado que las citoquinas liberadas por las células inmunes juegan un papel importante en su patogénesis. Algunas de estas citoquinas inducen también la expresión de factores pro-angiogénicos que son esenciales para el desarrollo de vasos sanguíneos en las lesiones endometriósicas [52].

Los macrófagos y neutrófilos peritoneales desempeñan un rol importante en la secreción de estas citoquinas que estimulan la actividad pro-angiogénica en la endometriosis [163,173]. Por ejemplo, la IL-1 $\beta$  producida principalmente por los macrófagos peritoneales activados, y también por las lesiones, incrementa los niveles de expresión *in vitro* de VEGF en cultivos de células estromales endometriósicas [174].

Además, se ha reportado que el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis contiene elevados niveles de IL-8, una citoquina con propiedades pro-angiogénicas, y esta citoquina es capaz de estimular la angiogénesis en el tejido endometrial eutópico y en las lesiones endometriósicas [175,176].

Se ha observado también, en un modelo de endometriosis experimental en ratón, que IL-6 y TNF- $\alpha$ , ambos secretados por los macrófagos peritoneales, incrementan la expresión de VEGF en los neutrófilos y macrófagos que se encuentran infiltrando las lesiones endometriósicas [173].

## TERAPÉUTICA

---

Si bien hasta el momento no existe ningún tratamiento que resulte completamente efectivo para erradicar la endometriosis como entidad patológica *per se*, es posible tratar los principales síntomas que genera esta enfermedad y restringir transitoriamente el crecimiento de las lesiones endometriósicas. La probabilidad de que los tratamientos logren tener un efecto favorable mitigando la enfermedad propiamente dicha y/o la sintomatología de la paciente es muy variable, dado que pueden ser efectivos en mayor o menor medida en algunas pacientes o, lamentablemente, no producir beneficio alguno en otras [177,178].

Si bien el tratamiento primario para la endometriosis es sin duda la remoción quirúrgica de las lesiones, desde hace ya varios años, es aceptada la administración de determinados fármacos para tratar principalmente el intenso dolor pélvico que suele asociarse a la enfermedad [14,179,180]. La estrategia terapéutica adoptada depende principalmente del tipo y gravedad de los síntomas que se desean tratar, del interés de la mujer por lograr un embarazo, de su edad y de su historia clínica. También deberán considerarse los potenciales efectos secundarios no deseados que el tratamiento puede generar en la paciente [58].

Las estrategias terapéuticas existentes para tratar los síntomas asociados a la endometriosis las podemos clasificar arbitrariamente de la siguiente manera:

**Tratamiento quirúrgico:** tiene como objetivo la remoción completa o la citorreducción parcial de los implantes endometriósicos visibles, y la eliminación de adherencias causadas por los mismos. En la mayor parte de los casos se lleva a cabo mediante una intervención laparoscópica. La cirugía puede ser *conservadora* si se tiene como finalidad extirpar o reducir el implante ectópico y las adherencias, o bien puede ser *radical* si se extrae el útero junto a las trompas de Falopio y los ovarios, este último procedimiento sólo está indicado en mujeres con un grado de endometriosis y manifestaciones sintomáticas severas, que no desean concebir en un futuro [46,181].

Se recurre a esta estrategia terapéutica no sólo para evitar el continuo crecimiento de las lesiones, sino también para intentar reducir el dolor pélvico y el grado de infertilidad. En ambos casos deben considerarse la localización de las lesiones endometriósicas, dado

que la extracción o reducción de las mismas puede afectar por ejemplo la reserva ovárica en los casos de intervenciones por endometriomas; también pueden verse afectados otros órganos importantes como la vejiga o los intestinos en los casos de lesiones endometriósicas localizadas en otros sitios de la cavidad peritoneal [58,182]. Además, debe considerarse el hecho que mediante la técnica quirúrgica muchas veces es complicado erradicar por completo las lesiones de tamaño microscópico, y esta limitación, entre otras condiciones propias de la fisiopatología de la enfermedad, tiene como consecuencia que la tasa de recurrencia puede llegar a un 25% en los primeros 2 años e incrementarse a un 40-50% a los 5 años de culminado el tratamiento [16].

**Tratamiento farmacológico:** consiste en la administración de fármacos con el objetivo de suprimir temporalmente la actividad fisiopatológica de los implantes ectópicos, reducir la inflamación a nivel peritoneal y los síntomas de dolor, motivo por el cual en muchos casos este tipo de tratamiento se debe administrar a largo plazo. Esta estrategia terapéutica obviamente no es la adecuada para las mujeres que deseen concebir, dado que los fármacos administrados promueven principalmente la inhibición de la síntesis de las hormonas ováricas, o bloquean su acción en los tejidos donde estas hormonas desempeñan su función [179,183]. Estos medicamentos se suelen administrar como terapia complementaria post-quirúrgica.

Actualmente, como primera opción de terapia farmacológica se eligen principalmente a los anticonceptivos orales combinados (AOC), conformados por derivados de estrógenos y progestágenos (análogos funcionales de la progesterona). Los AOC se han utilizado desde hace muchos años con una aceptable tasa de efectividad para tratar los dolores pélvicos y la dismenorrea asociada a la endometriosis; y dado que en la mayor parte de las pacientes no generan efectos secundarios adversos, se pueden administrar en forma sencilla y durante periodos de tiempo prolongados de manera continua o cíclica, y no representan un costo económico elevado [183]. Los AOC inducen un estado de hipoestrogenemia al reducir los niveles de gonadotropinas lo cual inhibe la ovulación, y en algunos casos disminuyen la intensidad de la menstruación, e inducen la atrofia no solo del endometrio eutópico sino también de las lesiones endometriósicas [180].

Una terapéutica alternativa a la administración de AOCs, consiste en administrar únicamente progestágenos, que en la mayor parte de los casos por ser análogos sintéticos

de la progesterona se los denomina progestinas. Estos análogos funcionales de la progesterona tienen la capacidad de generar un estado hipoestrógeno como consecuencia de la disminución de los niveles séricos de estrógenos y la anovulación que tienen lugar al suprimir el eje endocrino: hipotálamo-hipófisis-ovarios [177,184]. Este efecto tiene como resultado una reducción significativa del dolor pélvico crónico en un 70 a 90% de las mujeres con endometriosis [185]. Esta estrategia terapéutica por ser similar al uso de AOCs cuenta con las mismas ventajas, dado que no presenta efectos adversos considerables, por lo que se puede administrar por periodos prolongados, y es económicamente viable.

Otra opción terapéutica independiente de los AOC consiste en la administración de análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, según las siglas en inglés), los cuales tienen como función inhibir el eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovarios, interrumpiéndose de esta manera el ciclo menstrual y generando un consecuente estado hipoestrógeno que reduce la actividad metabólica de las lesiones endometrióticas y por consiguiente el dolor asociado a la endometriosis. Sin embargo, este tratamiento tiene efectos adversos considerables dado que la disminución de los niveles de estrógenos puede generar hipotrofia genital y/o la desmineralización del tejido óseo, motivo por el cual no es recomendable administrarlo por periodos de tiempo mayores a 6 meses [180,183].

Como terapia farmacológica complementaria a las ya mencionadas, también suelen administrarse drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs) para mitigar los dolores, si bien se ha reportado que su mecanismo de acción se basa, en parte, en la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> por medio de la inhibición de las enzimas COX [186], su eficacia para tratar los dolores asociados a la endometriosis aún es materia de controversia [183].

Asimismo, se han evaluado tratamientos farmacológicos alternativos, mucho de los cuales aún se encuentran en la fase experimental, como por ejemplo la administración de inhibidores de la enzima Aromatasa P450, enzima clave en la biosíntesis de estrógeno [187,188]; inhibidores selectivos de la enzima COX-2, crucial para la síntesis de prostaglandinas [189]; drogas que bloquean la acción del factor pro-inflamatorio TNF- $\alpha$  [178,183]; drogas anti-angiogénicas como inhibidores de VEGF o agentes angioestáticos [170,190]; moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs, según sus siglas en inglés) que antagonizan el efecto de los estrógenos al bloquear la unión de éstos a sus receptores [177,191].



verde; o el resveratrol: un componente de la piel de las uvas rojas, los cuales tienen efectos terapéuticos beneficiosos para restringir el avance de la endometriosis. Esta hipótesis se sustenta en diversos estudios llevados a cabo en modelos *in vitro* utilizando líneas celulares endometriales o cultivos primarios de células endometriales, como así también en experimentos realizados *in vivo* utilizando modelos murinos de endometriosis experimental, a partir de los cuales se ha comprobado que estos compuestos de origen natural tienen la capacidad de reducir la tasa de proliferación celular y la secreción de factores proangiogénicos como VEGF o bien de inducir la apoptosis de las células endometriales, y además logran restringir significativamente el crecimiento *in vivo* de las lesiones endometriósicas [192-194].

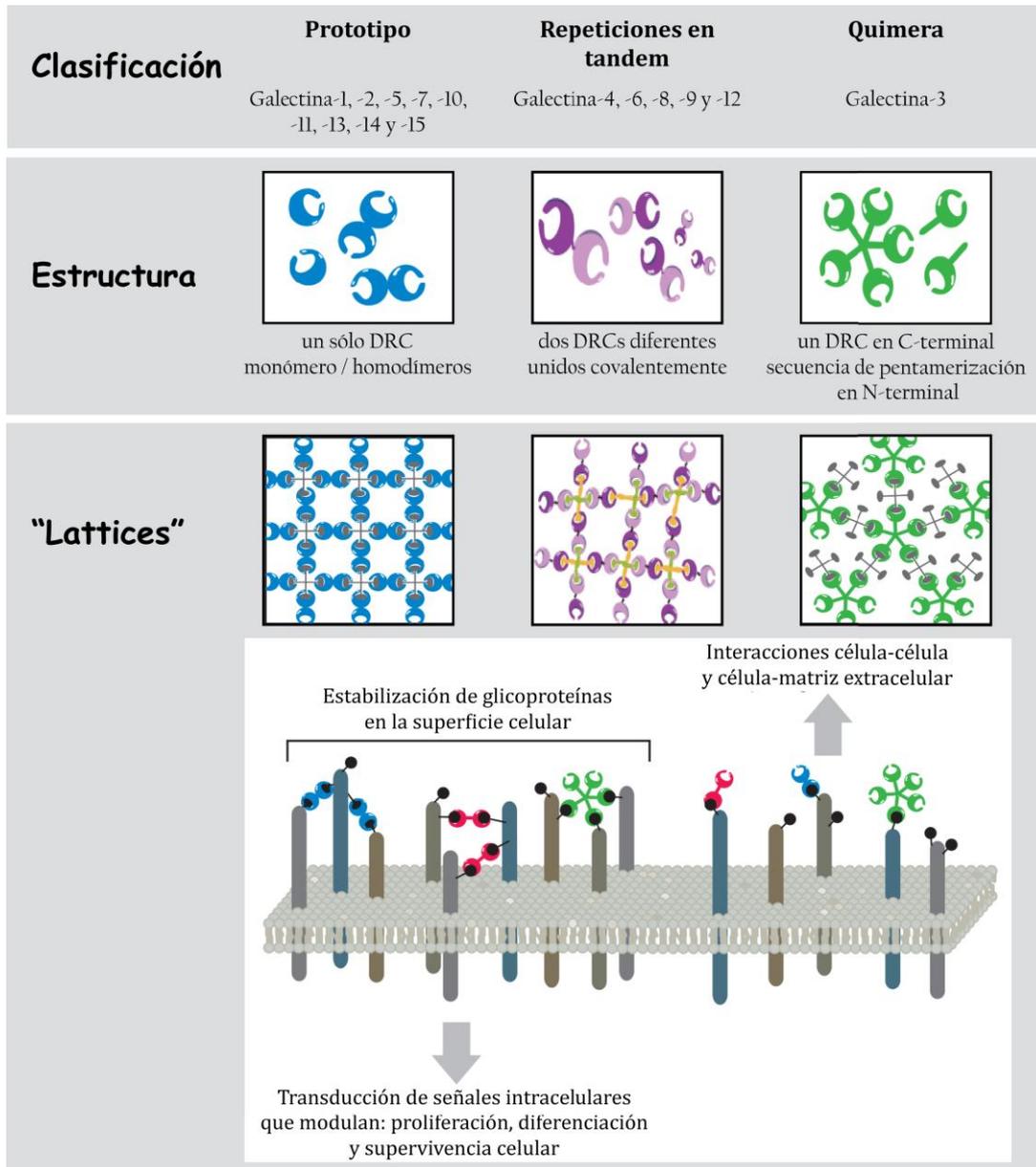
## GALECTINAS

---

Las galectinas constituyen una amplia, y evolutivamente conservada, familia de proteínas que poseen la capacidad de unirse a diversos residuos sacarídicos presentes en las glicoproteínas o glicolípidos de la membrana celular y de la matriz extracelular. Esta característica convierte a esta familia de proteínas en lectinas endógenas que reconocen en forma específica a los  $\beta$ -galactósidos presentes en los *N*- y *O*-glicanos presentes en las glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular. Para ello cuentan en su estructura con un dominio de unos 135 aminoácidos altamente conservado, denominado Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos (DRC) [195]. Los miembros de esta familia de lectinas se clasifican de acuerdo a sus características estructurales en: galectinas “prototipo”, de tipo “repeticiones en tándem” y de tipo “quimera” (**Figura 1.8**). Las galectinas “prototipo”, corresponden a los miembros: galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14 y -15, poseen un único DRC y pueden formar homodímeros mediante interacciones no covalentes, generando de este modo lectinas funcionalmente bivalentes. Las galectinas de tipo “repeticiones en tándem” como las galectinas-4, -6, -8, -9 y -12, poseen dos DRCs en la misma cadena polipeptídica, por lo cual si bien son bivalentes cada DRC que la integra puede reconocer estructuras sacarídicas diferentes. La única galectina de tipo “quimera” que se ha identificado hasta el momento es galectina-3 (Gal-3), la cual posee un DRC en el extremo C-

terminal y un dominio N-terminal involucrado en la formación de la estructura pentamérica que caracteriza a esta lectina [196,197].

La capacidad de formar dímeros bivalentes, o pentámeros en el caso de Gal-3, les confiere a estas lectinas la propiedad de establecer interacciones galectinas-glicanos en la superficie celular y formar estructuras complejas pero relativamente ordenadas denominadas "lattices" (**Figura 1.8**) [197]. Estas estructuras tienen implicancias biológicas importantes dado que promueven la estabilización e incrementan el tiempo de vida media de las glicoproteínas de membrana, como por ejemplo receptores, permitiendo que las mismas activen sus respectivas vías de señalización intracelular que pueden estar mediando mecanismos de proliferación, diferenciación o supervivencia celular, entre otros [198].



**Figura 1.8. Clasificación estructural de las galectinas y funciones biológicas asociadas a la formación de los "lattices".** Imagen modificada de: "Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices". Rabinovich y col. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007 [197].

Se han reportados varios trabajos en los que se demuestra el papel de estas lectinas endógenas como reguladores claves en determinados mecanismos fisiopatológicos, como por ejemplo la homeostasis de la respuesta inmune, la progresión tumoral y la neovascularización tumoral [198,199].

## ***GALECTINA-1***

---

Durante las dos últimas décadas se han publicado numerosas evidencias experimentales que le asignan a Gal-1 propiedades inmunorreguladoras que resultan trascendentales para actuar como un factor clave en la regulación de la homeostasis de la respuesta inmune [200]. Es así que se ha demostrado que esta lectina tiene la capacidad de inducir la apoptosis de los linfocitos T citotóxicos o de los linfocitos T colaboradores de tipo Th1 y Th17 [201]. Además se ha establecido que Gal-1 al ser secretada por las células tumorales, puede actuar sobre los linfocitos T colaboradores para invertir el perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias tipo Th1 como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  hacia un perfil de citoquinas anti-inflamatorias tipo Th2 como IL-4 e IL-10, generando de esta manera un microambiente de características inmunosupresoras en el estroma asociado al tumor [202]. Asimismo, se ha demostrado que las células T regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Treg) expresan y secretan niveles elevados de Gal-1, dejando así en claro el potencial inmunosupresor asociado a esta lectina [203]. Estas propiedades anti-inflamatorias de Gal-1 han sido ampliamente demostradas en numerosos modelos experimentales de inflamación crónica y autoinmunidad, como por ejemplo la artritis inducida por colágeno II, la colitis inducida por ácido sulfónico-trinitrobenzeno, la hepatitis inducida por concanavalina A, la diabetes espontánea en ratones NOD y la uveítis autoinmune experimental [204].

Además en un elegante trabajo realizado por Ilarregui y col. quedó claramente establecido que Gal-1 activa un circuito inmunosupresor mediante el cual induce la maduración de las células dendríticas hacia un perfil tolerogénico caracterizado por la secreción de IL-27, y esta citoquina es la responsable de activar a una población particular de linfocitos T regulatorios, los linfocitos Tr1, para que secreten grandes cantidades de IL-10, contribuyendo así a la resolución de un proceso fisiopatológico como lo es la encefalomiелitis autoinmune experimental [205].

En este contexto de regulación de la homeostasis inmunológica por parte de Gal-1 es importante resaltar que diversos tipos de tumores tales como melanoma, próstata, ovario y mama expresan y secretan Gal-1 al estroma asociado al tumor, lo cual les confiere una condición de inmunoprivilegio que les permite evadir la respuesta inmune antitumoral, hecho que se refleja en los trabajos que demuestran que en estos tumores la expresión de Gal-1 se

correlaciona positivamente con el grado de malignidad y el potencial metastásico de los mismos [206].

### ***GALECTINA-1 EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO***

---

Hace ya aproximadamente una década que se demostró que Gal-1 se expresa en endotelios tumorales en respuesta a estímulos inflamatorios, y que específicamente esta lectina endógena está implicada en diversas etapas de la vascularización tumoral [207]. Las evidencias que sustentan el rol pro-angiogénico de Gal-1 en la biología de las células endoteliales se basan principalmente en que la expresión de esta lectina se correlaciona positivamente con un incremento en la proliferación y migración de estas células [208]. En este sentido, en una serie de trabajos llevados a cabo por Thijssen y col. identificaron a Gal-1 como posible receptor en las células endoteliales de un péptido con propiedades anti-angiogénicas: Anginex (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) [209]. Además, estos autores encontraron que las células endoteliales pueden unir e incorporar las moléculas de Gal-1 secretadas por las células tumorales, y que esta lectina promueve específicamente la activación de las células endoteliales a través de la vía de señalización de H-Ras/Raf [208].

Recientemente, en un estudio publicado por Croci y col. se ha demostrado contundentemente que Gal-1 tiene la capacidad de activar las vías de señalización intracelular dependientes del receptor acoplado a tirosina quinasa VEGFR2, independientemente de la unión de su ligando canónico: VEGF [210]. De esta manera, Gal-1 estaría modulando la biología de las células endoteliales de modo tal de preservar el fenotipo angiogénico tumoral. Estos resultados tienen implicancias terapéuticas muy importantes ya que uno de los mayores obstáculos de las terapias anti-angiogénicas tendientes a bloquear la acción de VEGF radica en el hecho que se generan mecanismos compensatorios que les permiten a los tumores ignorar la falta de este factor de crecimiento y que consecuentemente los vuelve más agresivos e invasivos [211,212]. A su vez, en el estudio de Croci y col. se demuestra que el bloqueo de la interacción entre Gal-1 y los *N*-glicanos complejos presentes en la estructura molecular del VEGFR2 es suficiente a los fines de promover un proceso de remodelado de la vasculatura que restaura los niveles de O<sub>2</sub> en

el tumor y amplifica la respuesta inmune anti-tumoral al permitir el ingreso de células T efectoras, limitar la generación de células T regulatorias y bloquear la apoptosis de células T efectoras CD8<sup>+</sup> y de células T colaboradoras CD4<sup>+</sup> de tipo Th1 y Th17 [210].

## ***GALECTINA-1 EN LA FISIOLÓGÍA Y FISIOPATOLOGÍA REPRODUCTIVA***

Desde hace algunos años se han reportado trabajos en los cuales se determinó fehacientemente que Gal-1 se expresa en los tejidos placentarios y embrionarios [213,214], en donde promueve la tolerancia materno-fetal siendo éste un mecanismo elemental para la correcta implantación y desarrollo del embrión [215,216]. En relación a esto, se ha observado que ratones deficientes de Gal-1 (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) mostraron mayores tasas de pérdida fetal inducidas por estrés en comparación con los ratones de tipo salvaje, mientras que el tratamiento con Gal-1 recombinante evitó la pérdida fetal en los ratones deficientes de Gal-1 y restauró la tolerancia materno-fetal a través de la inducción de células dendríticas tolerogénicas que promueven la expansión de células T secretoras de IL-10 [217]. Por otro lado, también se ha observado que una población particular de células NK que residen en la decidua presentan características fenotípicas únicas que les permiten regular el diversos procesos involucrados en la interfase materno-fetal [218]. Una de las características que les confieren un fenotipo regulatorio a esta población particular de células NK uterinas consiste en el hecho de que presentan elevados niveles de expresión de Gal-1, por lo tanto se sugiere que esta lectina podría estar regulando tanto la arquitectura vascular como los mecanismos de inmunotolerancia presentes en la interfase materno-fetal [219]. Asimismo, se ha postulado que Gal-1 tiene un rol importante en los mecanismos de evasión inmunológica de la fase materno-fetal modulando los niveles de expresión del antígeno HLA-G en las células del trofoblasto [220].

Al igual que el estudio del rol de Gal-1 en la fisiología reproductiva, también ha atraído un gran interés el estudio del rol de esta lectina en los mecanismos fisiopatológicos involucrados en enfermedades de gran relevancia en el campo de la medicina reproductiva. Una de ellas es la pre-eclampsia, donde se ha demostrado que durante el tercer trimestre del embarazo existe un incremento en la expresión de Gal-1 en el tejido placentario de las

pacientes con pre-eclampsia en comparación con la placenta de mujeres que cursan embarazos normales [221]. Por otro lado, en un trabajo reciente se reportó que Gal-1 desempeña funciones pro-angiogénicas vitales durante las etapas tempranas del embarazo promoviendo la expansión de la red vascular en la decidua a través de señalización mediada por el receptor tipo-2 de VEGF. El bloqueo de Gal-1 resultó en una reducción de la angiogénesis y el consecuente desarrollo de un síndrome análogo a la pre-eclampsia en un modelo experimental murino, causado principalmente por la desregulación del proceso de placentación como consecuencia del remodelado defectuoso de las arterias espiraladas maternas [222]. Otras de las patologías de índole reproductiva estudiadas son los abortos recurrentes espontáneos, donde se ha observado que la reducción de la expresión de Gal-1 en el trofoblasto se traduce en una diferenciación defectuosa del mismo que puede conducir a la pérdida temprana del embarazo [223]. Además, se ha reportado que la unión de Gal-1 a la glicoproteína endometrial Mucina-1 podría contribuir a los mecanismos de transformación neoplásica en las células endometriales que pueden conllevar a la formación de carcinomas endometriales [224].

En base a estos antecedentes queda claro que Gal-1 es un factor clave involucrado en el desarrollo placentario adecuado y en la regulación de tolerancia materno-fetal, sugiriendo a esta lectina como potencial herramienta terapéutica en el tratamiento de las diversas patologías asociadas a complicaciones gestacionales.

## **GALECTINA-1 Y ENDOMETRIOSIS**

---

Considerando que hasta el momento no se han reportado trabajos que estudien el rol de Gal-1 en la fisiopatología de la endometriosis, y menos aún se ha develado la relevancia biológica potencial de Gal-1 en el proceso de crecimiento y neovascularización de las lesiones endometriósicas, creímos necesario plantear estudios que aporten evidencias experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, acerca de la contribución de Gal-1 en los eventos fisiopatológicos involucrados en la etiopatogenia de la endometriosis. Estos estudios están destinados a conocer, al menos en parte, el proceso fisiopatológico asociado a esta enfermedad con la finalidad de lograr en un futuro diseñar estrategias terapéuticas

racionales capaces de restringir el progreso de esta patología y mitigar los síntomas clínicos que afectan a las mujeres con endometriosis.

Finalmente, es importante destacar que la investigación básica aplicada a la clínica es la mejor herramienta con la que contamos para esclarecer los procesos que conducen al desarrollo de la endometriosis y lograr en un futuro, mejores alternativas terapéuticas para mejorar la calidad de vida de las pacientes afectadas por esta patología.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### ***HIPÓTESIS***

---

En base a los antecedentes mencionados en la introducción de este trabajo de tesis doctoral, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

- **Galectina-1 se expresa en las lesiones endometriósicas y está implicada en la promoción del crecimiento de estas lesiones en un sitio ectópico.**
- **El bloqueo específico de Galectina-1 en la cavidad peritoneal reduce el crecimiento y vascularización de las lesiones endometriósicas en un modelo murino de endometriosis experimental.**

Para verificar estas hipótesis se expondrán a continuación el objetivo general y los objetivos específicos de trabajo.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

Es nuestra intención aportar evidencia experimental relevante que contribuya a la caracterización de los mecanismos que posibilitan el desarrollo del tejido endometrial en un sitio ectópico, con el propósito de mejorar nuestro entendimiento sobre la etiopatogenia de la endometriosis. Siendo así, nos planteamos como objetivo general:

- ***Estudiar el rol de Galectina-1 en la fisiopatología de la endometriosis, evaluando su función en la regulación de los procesos de crecimiento y vascularización de las lesiones asociadas a esta enfermedad.***

Este objetivo se encuadra dentro de los esfuerzos realizados desde hace varios años por el laboratorio donde realicé este trabajo de tesis doctoral, que tienen como propósito revelar algunos de los mecanismos involucrados en la etiopatogenia de la endometriosis, con el anhelo de que en un futuro permitan el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficientes para tratar a las mujeres afectadas por esta patología.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

En base a lo establecido en el objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- a) Evaluar la expresión de Gal-1 en las lesiones y en el endometrio eutópico de pacientes afectadas por diferentes grados de severidad de endometriosis, como así también en el endometrio de pacientes controles.
- b) Evaluar la concentración de Gal-1 en el líquido peritoneal de pacientes afectadas por diferentes grados de severidad de endometriosis y en pacientes controles.
- c) Evaluar *in vitro* la expresión de Gal-1 en cultivos primarios de células epiteliales y estromales eutópicas y ectópicas de pacientes con endometriosis.
- d) Evaluar *in vitro* el efecto que tiene la inhibición de la expresión proteica de Gal-1 sobre la tasa de proliferación celular en cultivos primarios de células estromales eutópicas de pacientes con endometriosis y controles.
- e) Estudiar *in vivo* en un modelo murino de endometriosis experimental el rol de Gal-1 en el crecimiento de las lesiones endometriósicas.
- f) Evaluar en el modelo murino de endometriosis experimental el rol de Gal-1 en el desarrollo angiogénico de las lesiones endometriósicas.
- g) Evaluar *in vivo* el efecto del bloqueo específico de Gal-1 a nivel peritoneal sobre el crecimiento y vascularización de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en el modelo murino.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### EXPERIMENTOS CON MUESTRAS DE PACIENTES

#### ***PACIENTES***

Se utilizaron muestras de biopsias endometriales, biopsias de lesiones endometriósicas y líquidos peritoneales provenientes de pacientes con endometriosis, o bien de pacientes infértiles intervenidas por miomas uterinos, obstrucción tubaria y/o infertilidad sin causa aparente (estas pacientes corresponden al grupo control). En todos los casos las pacientes no recibieron tratamiento hormonal en los 3 meses previos a la intervención quirúrgica. Todas las muestras se obtuvieron de pacientes en edad reproductiva, de 18 a 44 años de edad, que se sometieron a laparoscopias diagnósticas y/o terapéuticas en el Instituto Argentino del Diagnóstico y Tratamiento (IADT), ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Estas biopsias son tomadas de rutina con la finalidad de realizar su evaluación anatómo-patológica, y parte de ese material fue derivado a nuestro laboratorio en condiciones de esterilidad para su posterior cultivo y/o procesamiento. El médico a cargo de realizar las intervenciones quirúrgicas fue el Dr. Javier Singla (MN: 74001 / MP: 221334). Se obtuvieron los correspondientes consentimientos informados firmados por todas las pacientes que fueron incluidas en este estudio. Tanto el consentimiento informado como los protocolos experimentales que involucran el uso de muestras humanas fueron debidamente aprobados por el Comité de Ética del IBYME-CONICET (Res.: CE 053-1/2012).

## ***INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE E INMUNOHISTOQUÍMICA***

Las muestras de biopsias fueron fijadas en una solución tamponada de formaldehído al 4%, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$ . Para los ensayos de inmunofluorescencia doble, las secciones se desparafinaron durante toda la noche en xileno y se hidrataron gradualmente a través de soluciones de alcoholes en concentraciones decrecientes y finalmente en agua. La recuperación del antígeno se llevó a cabo con citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) en un horno de microondas a 600 Watts de potencia. Todas las secciones se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente (TA) en buffer fosfato salino (PBS) con 10% de suero normal de cabra (NGS) y 0,3% de Triton X-100. A continuación, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4 °C con una dilución 1:500 de un anticuerpo policlonal de conejo anti-Gal-1 (provisto y validado por el Laboratorio de Inmunopatología del IBYME-CONICET, dirigido por el Dr. Gabriel Rabinovich [225]), y con una dilución 1:50 de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD31 (Dako Inc.). Ambos anticuerpos primarios se diluyeron conjuntamente en PBS con 1% de NGS y 0,3% Triton X-100. Al día siguiente, los cortes se lavaron extensivamente con PBS, y se incubaron durante 2 h a TA con los anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor488 (Life Technologies) y anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor568 (Life Technologies), ambos diluidos 1:100 en PBS con 0,15% de Triton X-100. Luego de varios lavados con PBS, se montaron los cortes y se guardaron a -20 °C hasta ser evaluados y fotografiados con un microscopio confocal (Nikon Eclipse E800/Nikon D-Eclipse C1).

El ensayo de inmunohistoquímica para detectar Gal-1 se realizó utilizando el mismo anticuerpo policlonal de conejo anti-Gal-1 diluido 1:2000. Todos los cortes histológicos se desparafinaron en xileno y se hidrataron gradualmente a través de soluciones de alcoholes en concentraciones decrecientes y finalmente en agua. Se inactivó la actividad de la peroxidasa endógena con una solución al 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 min, y la recuperación de antígeno se llevó a cabo con citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) en un horno de microondas a 600 Wats de potencia. A continuación, todos los cortes se bloquearon durante 2 h a TA con una solución al 4% de albúmina sérica bovina (BSA) diluida en PBS, y luego se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en PBS con 1% de BSA. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 h a TA con una mezcla comercial de

anticuerpos secundarios biotinilados (Dako Inc.), seguido por una incubación de 30 min con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako Inc.). Se reveló la marca utilizando como sustrato de la peroxidasa: 3,3'-Diaminobenzidina (DAB – Dako Inc.). Por último, los cortes se colorearon con hematoxilina de Gill, se deshidrataron gradualmente a través de soluciones de alcoholes en concentraciones crecientes, se aclararon en xileno y se montaron con Bálsamo de Canadá. Como control negativo, una sección de cada portaobjetos se incubó sin el anticuerpo primario. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital Nikon E5 acoplada a un microscopio estándar de campo claro (Nikon - Eclipse E200).

## ***CULTIVOS CELULARES***

---

Las biopsias de endometrio o de lesiones endometriósicas se lavaron con una mezcla de medios de cultivo DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen) suplementado con una solución de antibiótico-antimicóticos (Gibco, Invitrogen), luego de lo cual se cortó el tejido en fragmentos pequeños que se incubaron con 0.5 mg/ml de colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich) durante 2 h a 37 °C. La suspensión celular resultante se centrifugó a 100 xg durante 5 min, y por un lado se recuperó el sobrenadante conteniendo las células estromales en un tubo cónico de 50 ml; por otro lado se resuspendió con medio de cultivo el pellet conteniendo las células epiteliales y se centrifugó nuevamente a 100 xg durante 5 min. El sobrenadante se combinó con el sobrenadante de la primera centrifugación y esta fracción que contiene principalmente células estromales se centrifugó a 400 xg durante 5 min, se recuperó el pellet celular con medio de cultivo y se filtró a través de un filtro de nylon con poros de 40 µm de diámetro (BD Biosciences) para retener los cúmulos de células epiteliales. Se centrifugó este filtrado nuevamente a 400 xg durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células estromales en 1 ml de medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Invitrogen) y con una mezcla de antibiótico-antimicóticos (Gibco, Invitrogen). Las células epiteliales obtenidas previamente se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo MEM/D-valina (US Biological) suplementado con 10% de SFB (Gibco, Invitrogen) y con una mezcla de antibiótico-antimicóticos (Gibco, Invitrogen). A continuación, se determinó el número de células viables agregando una solución de azul

Tripán al 0.04% y contando en un hemocitómetro. Finalmente, se sembraron  $1 \times 10^6$  células en placas de 35 mm para los ensayos de inmunocitoquímica o bien  $2 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos para los ensayos de silenciamiento génico de Gal-1 y proliferación celular en los cultivos de células estromales.

## **INMUNOCITOQUÍMICA**

---

Los cultivos primarios de células estromales endometriales ectópicas y eutópicas, y de células epiteliales endometriales eutópicas, se llevaron a cabo como se describió en el apartado anterior.

Para el ensayo de inmunocitoquímica se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Gal-1 producido en conejo diluido 1:5000 [225], anti-vimentina producido en ratón (clon V9, Dako Inc.) diluido 1:5000, y anti-citoqueratina producido en ratón (clon AE1/AE3, Dako Inc.) diluido 1:500.

Se fijaron las células con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a TA, luego se lavaron varias veces con PBS y se permeabilizaron durante 10 min a TA con una solución de Triton X-100 al 0.2% en PBS. A continuación se inactivó la peroxidasa endógena durante 10 min a TA con una solución de  $H_2O_2$  al 3% en PBS. Se realizó el bloqueo de las placas durante 1 h a TA con una solución de BSA al 4% en PBS, y se incubó durante 1 h a TA con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 1% de BSA. Luego, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min con una mezcla de anticuerpos secundarios biotinilados (Dako Inc.), seguido de otra incubación por 30 min con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako Inc.). Finalmente, se reveló la señal utilizando DAB como sustrato de la peroxidasa. Los núcleos fueron coloreados con hematoxilina de Gill, y luego se montaron los cubreobjetos en las placas. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital Nikon E5 acoplada a un microscopio estándar de campo claro (Nikon Eclipse E200). Como control negativo, un sector de la placa del cultivo se trató sin el anticuerpo primario.

## **WESTERN BLOT DE GALECTINA-1**

---

Se prepararon los homogenatos de las biopsias obtenidas de pacientes utilizando un homogenizador eléctrico para disgregar mecánicamente el tejido en 1 ml de buffer de lisis cada 100 mg de tejido (buffer de lisis: Tris-HCl 50 mM (pH: 7.5), NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 1%, SDS 0.1%, Glicerol 10% y una dilución 1:500 de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich)). Luego se centrifugaron los homogenatos a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se guardó el sobrenadante a -80 °C. La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante un ensayo de Bradford, utilizando patrones de concentraciones conocidas de BSA.

Se resolvieron 30 µg de proteínas totales en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE), y se electrotransfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

Se bloquearon las membranas durante 1 h a TA con una solución de leche en polvo descremada diluida al 5% en buffer Tris salino (TBS) con 0.1% de Tween-20 (TBS-T). A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación con el anticuerpo primario anti-Galectina-1 producido en conejo [225] diluido 1:3000 en TBS-T. Luego de 3 lavados de 5 min en TBS-T, se incubaron las membranas durante 1 h a TA en agitación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Calbiochem) diluido 1:2000 en TBS-T. Se realizaron 3 lavados de 5 min en buffer TBS-T, se incubaron las membranas durante 1 min con el reactivo de quimiluminiscencia ECL (Pierce) y se adquirieron las imágenes de las bandas en un equipo de revelado digital (G-Box, SynGene). Se utilizó el programa informático ImageJ (NIH) para llevar a cabo el análisis de densitometría óptica de las bandas obtenidas.

Conjuntamente, se realizaron ensayos de Western blot para inmunodetectar β-actina, que se utilizó como control de carga y para relativizar la densidad óptica de las bandas del Gal-1. Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la inmunodetección de Gal-1, se incubaron las membranas durante toda la noche a 4 °C en agitación con un anticuerpo primario anti β-actina producido en ratón (Abcam) diluido 1:500 en TBS-T, y luego de los correspondientes lavados se incubaron durante 1 h a TA con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (R&D Systems) diluido 1:1000 en TBS-T.

### ***ELISA DE GALECTINA-1 EN LOS LÍQUIDOS PERITONEALES***

Los líquidos peritoneales se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se guardó a -20 °C.

Se determinó la concentración de Gal-1 usando una técnica de ELISA puesta a punto en el Laboratorio de Inmunopatología dirigido por el Dr. Gabriel Rabinovich (IBYME-CONICET) [225]. En resumen, placas High Binding (Costar, Corning) de 96 pocillos se recubrieron incubando durante 18 h a 4 °C con el anticuerpo de captura anti-Gal-1 de conejo (2 mg/ml) diluido en 0.1 M de carbonato de sodio, pH 9.5. Luego se lavaron los pocillos 3 veces con 0.05% de Tween-20 en PBS y se incubaron durante 1 h a TA con la solución de bloqueo (2% de BSA en PBS). A continuación, se incubaron 100 µl de las muestras previamente diluidas 1:5 en PBS con 1% de BSA durante 18 h a 4 °C. Luego las placas se lavaron y se incubaron durante 1 h a TA con 100 ng/ml del anticuerpo de detección biotinilado anti-Gal-1 de conejo (R&D Systems). A continuación las placas se lavaron 3 veces y se incubaron durante 30 min con 0.33 g/ml de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich). Luego de un nuevo lavado, se añadió a las placas 100 µl de solución de TMB (0.1 mg/ml tetrametilbencidina y 0.06% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer de citrato-fosfato, pH 5.0). La reacción se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Las densidades ópticas se determinaron en un lector de placas Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 450 nm. Se realizó en paralelo una curva de concentraciones conocidas de Gal-1 recombinante en un rango que va desde 2.5 a 160 ng/ml.

### ***SILENCIAMIENTO TRANSITORIO DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES***

Se utilizaron vectores plasmídicos pSIREN-RetroQ (Clontech) conteniendo las siguientes secuencias de ARN<sup>sh</sup> antisentido para silenciar la expresión de Gal-1:

**Vector 1 (p1):** 5'-CATCCGCTGCCAGATGGATACGAATTCAAGAGATTCGTATCCA  
TCTGGCAGCTTTTTTG-3'.

**Vector 2 (p2):** 5'-CATCCGACGGTGACTTCAAGATCAAATTCAAGAGATTTGATCT  
TGAAGTCACCGTCTTTTTTG-3'.

**Vector control (pC)** con una secuencia de ARN aleatoria: 5'GATCCCCTCCATATCTCG  
CGCGTCTTCAAGAGAGACGCGGAGATATGGAGGTTTTTTG3'.

Estos vectores fueron provistos y validados por el Laboratorio de Inmunopatología dirigido por el Dr. Gabriel Rabinovich (IBYME) [225].

Se realizaron transfecciones transitorias con los mencionados vectores en cultivos primarios de células estromales endometriales siguiendo el protocolo reportado en el trabajo de Castro y col. [226]. Brevemente, se cultivaron las células estromales endometriales aisladas de las muestras de biopsias de pacientes con endometriosis o controles hasta que los cultivos alcanzaron un 50-60% de confluencia. Entonces, se preparó una mezcla de transfección para cada uno de los vectores en 100  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM/F-12, sin suplementar con SFB ni antibióticos/antimicóticos, pero conteniendo 6  $\mu$ l del reactivo de transfección GeneJammer (Agilent technologies) y 2  $\mu$ g de cada vector plasmídico. A continuación, los cultivos fueron transfectados agregando los 100  $\mu$ l de esta mezcla de transfección a cada pocillo de una placa de 6 pocillos que contenía 900  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM/F-12 sin SFB ni antibióticos/antimicóticos. Luego de incubar por 4-5 h a 37 °C, se agregó 1 ml más de medio de cultivo por pocillo y se continuó el cultivo por 24 h, tiempo en el que se cambió a medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y se continuó el cultivo por otras 48 h, completando así un tiempo de transfección transitoria de 72 h.

Para evaluar los niveles de expresión proteica de Gal-1 en dichos cultivos, se lisaron las células en 50  $\mu$ l de buffer de lisis y se determinó la concentración de proteínas mediante un ensayo de Bradford utilizando patrones de concentraciones conocidas de BSA.

Se resolvieron 10  $\mu$ g de proteínas totales en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida al 15% (SDS-PAGE), y se electrotransfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, sobre las cuales se llevó a cabo la inmunodetección de Gal-1 y de  $\beta$ -actina siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para las muestras de biopsias

## **ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR IN VITRO**

Luego de 72 h de transfección de los cultivos primarios de células estromales endometriales con los vectores que tienen las secuencias de ARN $sh$  que inhiben la expresión de Gal-1 (p1 y p2) o la secuencia aleatoria (pC), se determinó la tasa de proliferación celular *in vitro* mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit de proliferación celular Cell Titer Aqueous One Solution (Promega). Se añadió a cada pocillo 100  $\mu$ l de reactivo y se incubó durante 2 h a 37 °C, luego se midió la absorbancia en un lector de placas Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 490 nm. El reactivo consiste en una solución de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS), el cual es reducido por las células para formar un producto: formazán, cuya absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas. Se tomaron los valores promedios correspondientes a 4 réplicas por condición experimental. La proliferación celular se expresa como el porcentaje relativo a los pocillos tratados con el vector control de secuencia aleatoria (pC) establecido como 100%.

## **MARCACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES CON LECTINAS Y SU ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Se establecieron cultivos primarios de células estromales aisladas de biopsias endometriales de pacientes con endometriosis o controles. Al momento en que los cultivos alcanzaron un 90% de confluencia, se levantaron las células y se extrajeron de las placas de cultivo tratándolas durante 10 min a 37 °C con una solución de EDTA 0.5 mM en PBS. Se determinó el número de células viables utilizando una solución de azul Tripán al 0.04% en PBS y contando con un hemocitómetro. A continuación se lavaron las células 2 veces en buffer de lectinas (NaCl 150 mM, HEPES 10 mM y 1% de BSA), y se incubaron  $1 \times 10^6$  células viables durante 1 h a 4 °C con las lectinas biotiniladas: Fitohemaglutinina-L (PHA-L, 2  $\mu$ g/ml, Vector Labs) o Aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA, 5  $\mu$ g/ml, Vector Labs). Luego, se lavaron las células 2 veces en buffer de lectinas y se incubaron durante 45 min a 4 °C con una dilución 1:150 de estreptavidina conjugada al fluorocromo Alexa Fluor488 (Vector Labs). Finalmente, se lavaron las células nuevamente 2 veces en buffer de lectinas y se fijaron en

200  $\mu$ l de una solución de paraformaldehído al 1% en PBS. Las células marcadas con estas lectinas, se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences), se adquirieron los datos utilizando el programa FACSDiva 6.0 (BD Biosciences) y se analizaron con el programa informático Cyflogic 3.0 (Cyflogic). La capacidad de unión de estas lectinas a sus respectivos glicanos blanco en la superficie celular se calculó como la intensidad de fluorescencia media relativa (IFMr = [IFM de la marca con lectina – IFM del control sin marcar] / IFM del control sin marcar)

## **EXPERIMENTOS CON EL MODELO MURINO DE ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL**

### **ANIMALES**

Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 de 2 meses de edad, de tipo salvaje (wild-type) o genéticamente modificados: *Lgals1*<sup>-/-</sup>, los cuales no expresan Gal-1 en todo el organismo (knock-out de Gal-1). Ambos grupos de ratones fueron gentilmente suministrados por el Laboratorio de Inmunopatología dirigido por el Dr. Gabriel Rabinovich (IBYME-CONICET).

Los animales fueron alojados en las instalaciones del Bioterio Central del IBYME-CONICET, donde fueron mantenidos con un ciclo 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*, en condiciones de temperatura y limpieza adecuadas. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las directrices del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y todos los protocolos utilizados en este estudio que involucraron el uso de animales fueron aprobados por el Comité de Ética del IBYME-CONICET (Res.: CE 053-1/2012).

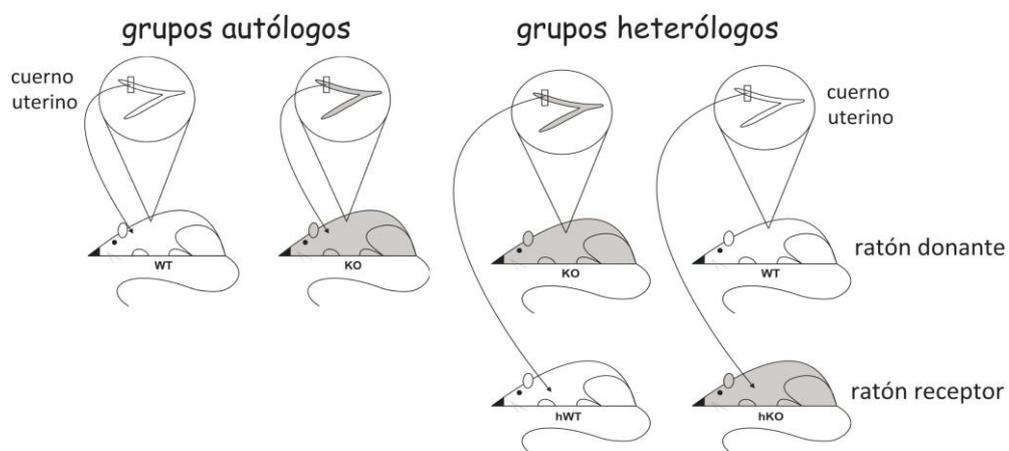
### **INDUCCIÓN QUIRÚRGICA DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS**

Las lesiones endometriósicas fueron inducidas experimentalmente en los ratones llevando a cabo trasplantes autólogos o heterólogos de fragmentos de cuerno uterino al mesenterio intestinal, tal como se ha descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio [170,227-229].

Para explicarlo en forma resumida, los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina (110 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente) e inmediatamente se realizó una laparotomía para exponer los cuernos uterinos y los intestinos.

Para conformar los cuatro grupos experimentales que se utilizaron en una parte de esta tesis doctoral se realizaron los siguientes procedimientos quirúrgicos: en los dos grupos autólogos denominados wild-type (WT) y knock-out de Gal-1 (KO), el cuerno uterino derecho fue removido (sin quitar el ovario), se abrió longitudinalmente y se cortó en 3 fragmentos de  $\approx 4 \text{ mm}^2$  que fueron suturados al mesenterio intestinal del mismo animal, colocando el tejido endometrial en contacto con la capa serosa del mesenterio. En el tercer grupo denominado wild-type heterólogo (WTh), los cuernos uterinos fueron removidos de ratones donantes  $Lgals1^{-/-}$  y se trasplantaron al mesenterio intestinal de ratones receptores wild-type singeneicos. Finalmente, en el cuarto grupo denominado knock-out heterólogo (KOh), los cuernos uterinos fueron removidos de ratones donantes wild-type y se trasplantaron al mesenterio intestinal de ratones receptores  $Lgals1^{-/-}$  singeneicos (**Figura 3.1**).

En todos los grupos se dejó que el tejido endometrial ectópico forme las lesiones endometriósicas durante el transcurso de 4 semanas, en ese momento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.



**Figura 3.1. Grupos autólogos y heterólogos de ratones con endometriosis experimental.** En la figura se esquematiza el procedimiento de trasplante quirúrgico autólogo o heterólogo de los fragmentos de cuernos uterinos llevado a cabo para conformar cada grupo experimental. WT: grupo wild-type, KO: grupo knock-out de Gal-1, WTh: grupo wild-type heterólogo y KOH: grupo knock-out heterólogo. Modificado de: "Targeting galectin-1-induced angiogenesis mitigates the severity of endometriosis", Bastón y col. *The Journal of Pathology* 2014 [229].

## ***BLOQUEO DE GALECTINA-1 EN LA CAVIDAD PERITONEAL***

Para realizar este experimento, primero se indujeron lesiones endometriósicas autólogas en ratones wild-type tal como se describe en el apartado anterior.

Pasada una semana de la cirugía de inducción de endometriosis, a un grupo de ratones (grupo anti Gal-1) se les inyectó 2 veces por semana por vía intraperitoneal una dosis de 15 mg/kg de peso corporal del anticuerpo monoclonal neutralizante anti-Gal-1 (también denominado F8.G7), el cual fue producido y validado por el Laboratorio de Inmunopatología dirigido por el Dr. Gabriel Rabinovich (IBYME-CONICET) [225]. Este tratamiento se realizó hasta finalizar la cuarta semana post-inducción quirúrgica de la endometriosis, momento en el cual los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

A otro grupo de ratones con endometriosis experimental se les inyectó en iguales condiciones la misma dosis de un anticuerpo IgG como control de isotipo (grupo control).

## ***EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS***

Inmediatamente después de sacrificar los animales, se realizó una pequeña incisión en la pared abdominal y se lavó la cavidad peritoneal una sola vez con 1.5 ml de solución fisiológica para recuperar los factores solubles presentes en la cavidad. Seguidamente, el líquido peritoneal se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min a 4 °C y los sobrenadantes se guardaron a -20 °C.

A continuación, se abrió completamente la cavidad peritoneal realizando una gran incisión en la línea medioventral de la pared abdominal, y se procedió a identificar y contar las lesiones endometriósicas desarrolladas. Posteriormente, se midieron dos diámetros perpendiculares de cada lesión con un calibre milimetrado y se calculó el volumen de las mismas aplicando la siguiente fórmula:  $V = (\frac{3}{4}) \pi r^2 R$ , donde  $r < R$  [170,227,229]. Los resultados de este análisis se expresaron como la media del número de lesiones establecidas por ratón y como la media del volumen (en mm<sup>3</sup>) de las lesiones por ratón.

### ***EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS***

Se extrajeron las lesiones y se fijaron durante 24 h a 4 °C en una solución tamponada de formaldehído al 4%. Luego se deshidrató el tejido en un gradiente de concentraciones crecientes de alcoholes, se incluyó en tacos de parafina y se cortó en secciones seriadas de 5 µm de grosor. Dos secciones no contiguas de cada muestra fueron coloreadas con hematoxilina-eosina y se examinaron microscópicamente para identificar las características histológicas típicas de las lesiones de endometriosis: la presencia de glándulas y estroma.

### ***PERFUSIÓN VASCULAR PARA MARCAR LOS VASOS SANGUÍNEOS***

Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina (110 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente), y se les administró inmediatamente una inyección intracardíaca de 70 µl de una solución conteniendo 2 mg/ml de la lectina derivada del tomate *Lycopersicon esculentum*, conjugada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (Vector Labs). Esta lectina tiene la capacidad de unirse a determinados glicanos que forman parte de las glicoproteínas de la superficie de las células endoteliales y por lo tanto marca los vasos sanguíneos de color verde [230]. Luego de 7 min de haber administrado la lectina, se inyectó por vía intracardíaca solución fisiológica estéril y se dejó actuar por 5 min para quitar del torrente sanguíneo los restos de lectina circulante. Finalmente se fijaron los vasos sanguíneos inyectando una solución tamponada de paraformaldehído al 4%, luego de lo cual se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se extrajeron las lesiones endometriósicas. Estas lesiones se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se incluyeron utilizando el compuesto OCT (Optimum Cutting Temperature, Tissue-Tek) para luego cortarlas en secciones de 20 µm de grosor con un criostato (Cryotome E, Thermo Scientific). Los cortes obtenidos se guardaron a -70 °C.

## **INMUNOFLUORESCENCIA**

---

Los cortes se descongelaron durante 15 min a TA y se lavaron 2 veces con PBS. Todas las secciones se bloquearon durante 2 h a TA con SFB diluido al 10% en PBS. A continuación, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Gal-1 [225] diluido 1:100 en PBS con 1% de SFB y 0.3% de Tritón X-100. Luego, las secciones fueron lavadas con PBS, y se incubaron durante 2 h a TA con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo Cy3 (Life Technologies) diluido 1:300 en PBS con 0.15% de Tritón X-100. Por último, se lavaron los cortes con PBS, se montaron los cubreobjetos con Vecta-Shield (Vector Labs) y se guardaron a -20 °C. Las microfotografías se adquirieron con un microscopio confocal (Nikon Eclipse E800/Nikon D-Eclipse C1).

## **INMUNOHISTOQUÍMICA**

---

Para realizar los ensayos de inmunohistoquímica se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Gal-1 producido en conejo [225] diluido 1:500, anti-CD34 producido en rata (Abcam) diluido 1:50, anti-Factor de von Willebrand (vWF) producido en conejo (Dako Inc.) diluido 1:400, anti-VEGF producido en conejo (R&D Systems) diluido 1:50, anti-VEGFR2 producido en conejo (Cell Signaling) diluido 1:150, y anti-F4/80 producido en rata (eBioscience) diluido 1:500.

Brevemente, todas las secciones se desparafinaron en xileno y se hidrataron gradualmente a través de soluciones de alcoholes en concentraciones decrecientes y finalmente en agua. Se inactivó la actividad de la peroxidasa endógena durante 30 min con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. La recuperación de antígeno para Gal-1 y VEGF se llevó a cabo con citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) en un horno de microondas a 600 Watts de potencia; y para el vWF, VEGFR2 y F4/80 con tratamientos sucesivos de 30 min con 0.1% de Tritón X-100 seguido por 30 min con 20 µg/ml de proteinasa-K diluida en PBS. A continuación, todos los cortes se bloquearon durante 2 h a TA con BSA al 4% en PBS, y luego se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los respectivos anticuerpos primarios diluidos en PBS con 1% de BSA. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 h a TA con un anticuerpo

biotinilado anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich) diluido 1:200 en PBS, o con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de rata (Sigma-Aldrich) diluido 1:500 en PBS, según corresponda. A continuación se incubó durante 30 min a TA con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako Inc.) y se reveló la señal con DAB (Dako Inc.) como sustrato de la peroxidasa. Por último, las secciones se colorearon con hematoxilina de Gill, se deshidrataron gradualmente a través de soluciones de alcoholes en concentraciones crecientes, se aclararon en xileno y se montaron los cubreobjetos con Bálsamo de Canadá.

Como control negativo, una sección de cada muestra se ensayó sin el respectivo anticuerpo primario.

En todos los casos, se fotografiaron 5-6 campos por sección con una cámara digital Nikon E5 acoplada a un microscopio estándar de campo claro (Nikon - Eclipse E200). Se determinó el área vascular relativa por campo midiendo el área de los vasos sanguíneos inmunomarcados con el vWF o VEGFR2 mediante el uso del software ImageJ (NIH), la suma del área vascular de cada campo se relativizó por el área total del tejido observado en el mismo campo, y luego se promediaron los valores relativos obtenidos para cada grupo experimental.

El porcentaje de macrófagos se calculó a partir del número de células inmunomarcadas con F4/80 en un total de 100 células contadas en cada uno de los 5-6 campos analizados para cada muestra, luego se promediaron los valores porcentuales obtenidos para cada grupo experimental.

### ***ELISA DE VEGF-A Y CXCL2-KC EN EL LÍQUIDO PERITONEAL***

Las concentraciones de VEGF-A y CXCL2-KC en el líquido peritoneal recolectado de los ratones con endometriosis experimental se midieron utilizando kits comerciales de ELISA y siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Calbiochem QIA52 para VEGF-A y R&D Systems DY453 para CXCL2-KC). Todas las muestras se analizaron por duplicado y los valores de las concentraciones se expresan en pg/ml.

## ***ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

---

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático Prism 5.0 (GraphPad). Las comparaciones estadísticas entre los grupos autólogos y heterólogos (WT, KO, WTh y KOh) en los casos en que la distribución de los datos cumple con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se realizaron aplicando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni; y en los casos en que estos supuestos no se cumplen se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. En los experimentos de neutralización de Gal-1 en la cavidad peritoneal, las comparaciones estadísticas entre los grupos anti-Gal-1 vs control, se realizaron aplicando la prueba de t-Student no pareada cuando los datos presentaban una distribución normal y las varianzas eran homogéneas; y cuando estos supuestos no se cumplieron se recurrió a la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En todos los análisis realizados se consideró que existía significancia estadística cuando  $p < 0.05$ .

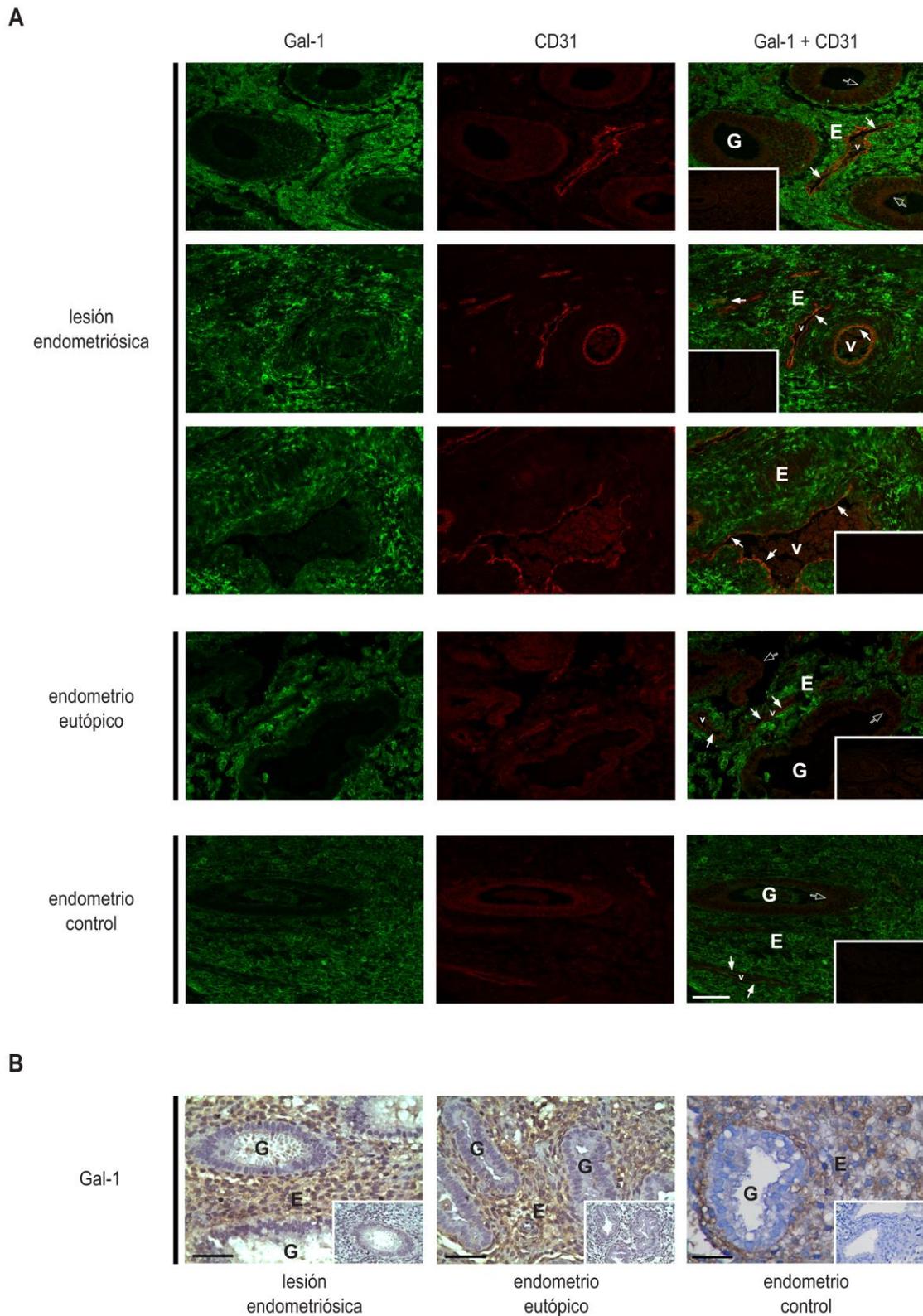
## 4. RESULTADOS

### RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON MUESTRAS DE PACIENTES

#### *LOCALIZACIÓN TISULAR DE GALECTINA-1 EN LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS Y EN EL ENDOMETRIO EUTÓPICO*

En principio, decidimos analizar la expresión de Gal-1 en las lesiones endometriósicas y en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, como así también en el endometrio de pacientes intervenidas por otras patologías no asociadas a la endometriosis (pacientes controles) como por ejemplo: miomas uterinos, obstrucción tubaria e infertilidad sin causa aparente. Para lo cual se llevo a cabo una inmunomarcación específica de Gal-1 y de CD31, como marcador de células endoteliales, mediante técnicas de inmunofluorescencia doble e inmunohistoquímica.

En todos los casos analizados se observó una expresión selectiva de Gal-1 principalmente en las células estromales y con menor intensidad también en las células endoteliales, ya sea que se trate de las lesiones endometriósicas o bien del endometrio eutópico de pacientes con endometriosis o controles (**Figura 4.1A y 4.1B**). Además, es importante destacar que las marcaciones por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica revelaron que Gal-1 no se expresa en las células epiteliales ectópicas ni eutópicas de pacientes con endometriosis, como así tampoco en las células epiteliales endometriales de pacientes controles (**Figura 4.1A y 4.1B**).

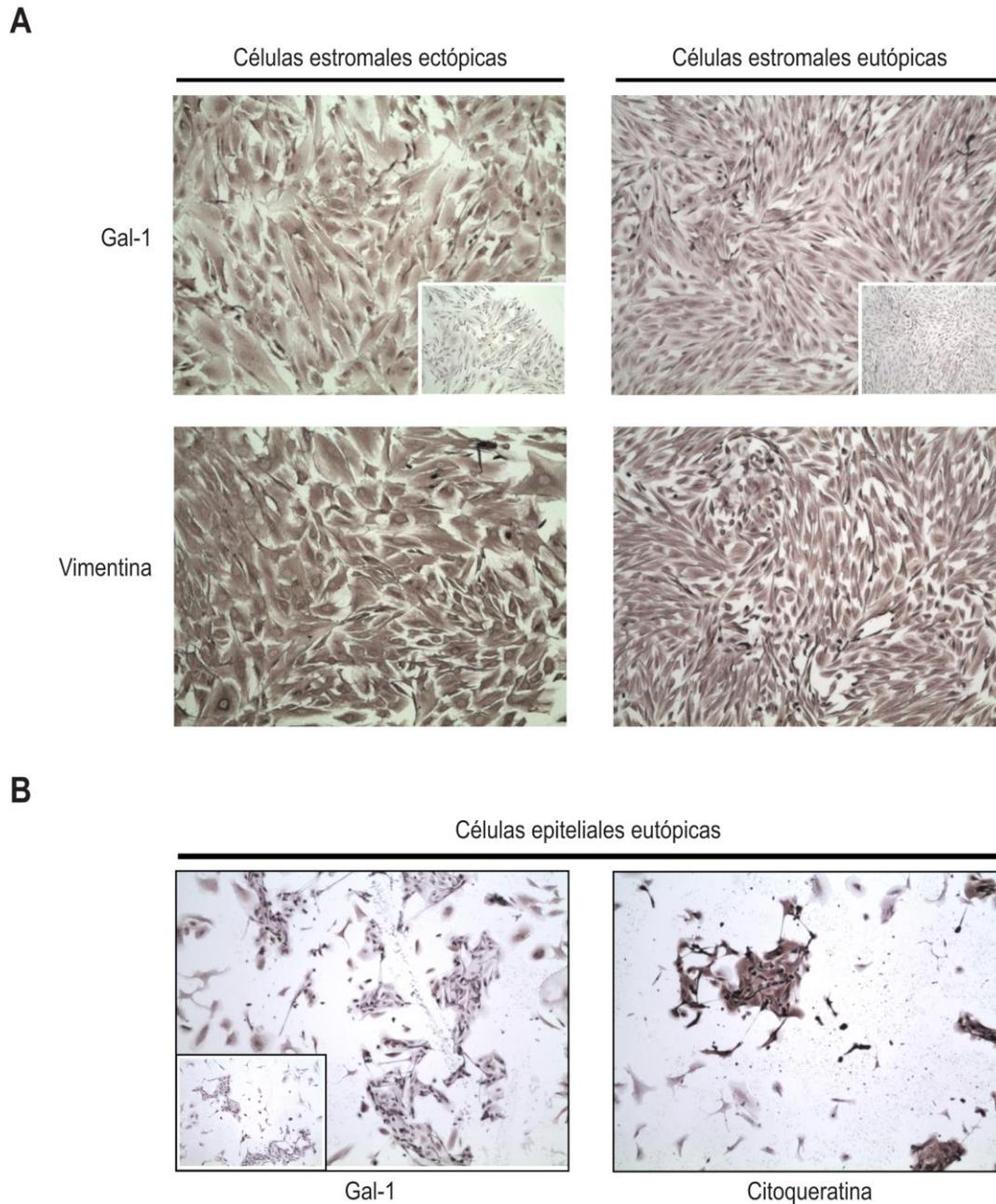


**Figura 4.1. Expresión de Gal-1 en las lesiones endometriósicas, en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y en el endometrio de pacientes controles. (A)** Las microfotografías son representativas del ensayo de inmunofluorescencia doble para la detección de

Gal-1 (verde) y el marcador de células endoteliales CD31 (rojo) en secciones de tejido de lesiones ectópicas, de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y de endometrio de pacientes del grupo control (n = 3 por grupo). Barra de escala: 50  $\mu$ m. Inserto: control negativo sin anticuerpos primarios. G: glándula, E: estroma, v: vasos sanguíneos. Las flechas blancas rellenas indican las células endoteliales inmunomarcadas para Gal-1 y CD31, y las flechas blancas abiertas indican la presencia de marca no específica en las células epiteliales. **(B)** Las microfotografías son representativas del ensayo de inmunohistoquímica para la detección de Gal-1 en secciones de tejido de lesiones endometriósicas, de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y de endometrio de pacientes control (n = 5 por grupo). Barra de escala: 50  $\mu$ m. Inserto: control negativo sin anticuerpo primario. G: glándula, E: estroma.

Para corroborar el patrón de expresión tisular de Gal-1 observado en los cortes histológicos de las biopsias, realizamos a continuación una separación selectiva de las células estromales y epiteliales a partir de las muestras de biopsias de lesiones ectópicas y endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, las cultivamos en las condiciones adecuadas para obtener ambas poblaciones celulares con un alto grado de pureza y analizamos la expresión de Gal-1 en estos cultivos primarios mediante una técnica de inmunocitoquímica.

Al igual que lo observado en los cortes histológicos de las muestras de biopsias obtenidas de pacientes con endometriosis, también en los cultivos celulares primarios Gal-1 se expresa intensamente en las células estromales ectópicas y eutópicas (**Figura 4.2A, panel superior**). Se corroboró la pureza celular de estos cultivos inmunodetectando la expresión de vimentina, un marcador por excelencia de células estromales (**Figura 4.2A, panel inferior**). Además, puede corroborarse la ausencia de expresión de Gal-1 en los cultivos primarios de células epiteliales eutópicas (**Figura 4.2B, izquierda**). Para confirmar el fenotipo epitelial de estas células se utilizó un anticuerpo anti-citoqueratina, por ser esta molécula un marcador característico de células epiteliales (**Figura 4.2B, derecha**).



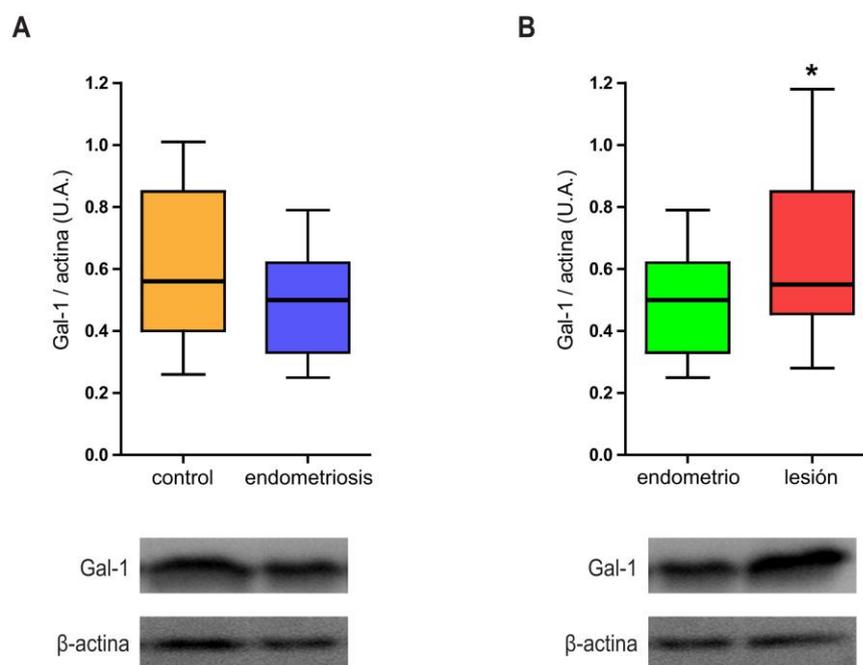
**Figura 4.2. Expresión de Gal-1 en cultivos primarios de células estromales ectópicas y eutópicas, y de células epiteliales eutópicas, provenientes de pacientes con endometriosis.**

Las microfotografías son representativas del ensayo de inmunocitoquímica para la detección de Gal-1 en cultivos primarios de **(A)** células estromales ectópicas y eutópicas, y de **(B)** células epiteliales eutópicas de pacientes con endometriosis (n = 5 por grupo). Magnificación: x100. Inserto: control negativo sin anticuerpo primario.

### **NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA DE GALECTINA-1 EN BIOPSIAS DE LESIONES ENDOMETRIÓICAS Y DE ENDOMETRIO EUTÓPICO**

Teniendo en cuenta que observamos una intensa expresión de Gal-1 en las lesiones endometriósicas y en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, como así también en el endometrio de pacientes sin endometriosis (pacientes controles), decidimos evaluar en forma semicuantitativa los niveles de expresión proteica de Gal-1 en estos tejidos mediante un ensayo de Western blot.

Si bien no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión proteica de Gal-1 entre el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y el tejido endometrial de pacientes controles ( $p = 0.1037$ , **Figura 4.3A**); es sumamente importante destacar que existe un incremento significativo en los niveles de expresión proteica de Gal-1 en las lesiones endometriósicas respecto del endometrio eutópico de pacientes con endometriosis ( $p = 0.0320$ , **Figura 4.3B**).

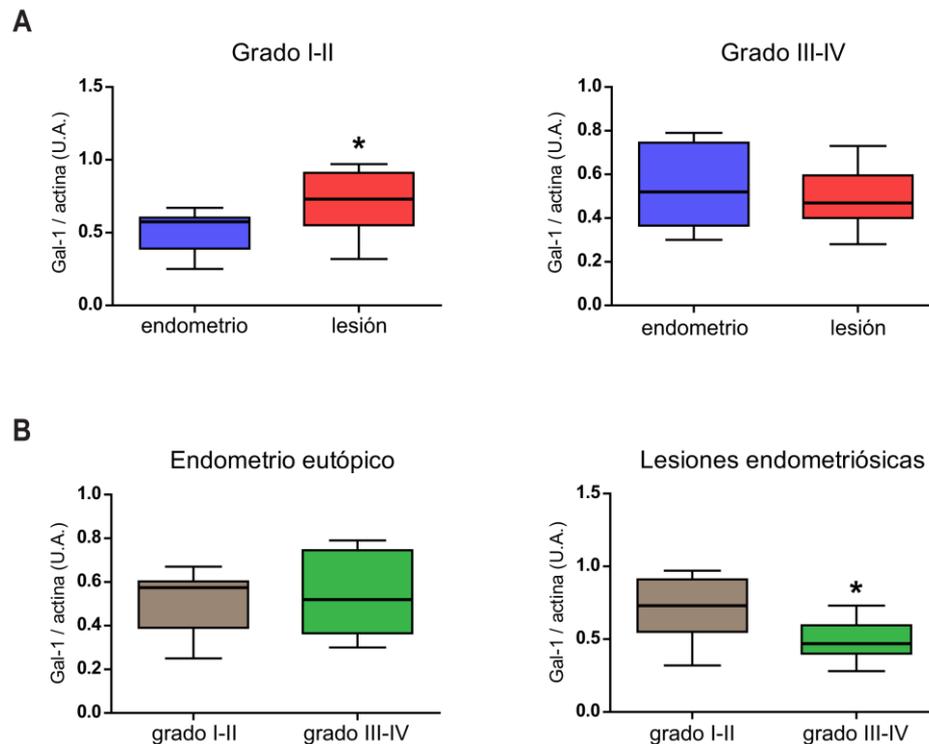


**Figura 4.3. Niveles de expresión proteica de Gal-1 en biopsias de pacientes con endometriosis y controles.** Los gráficos muestran los niveles de expresión proteica de Gal-1 determinados por Western blot en **(A)** homogenatos de biopsias de tejido endometrial de pacientes con endometriosis y pacientes controles ( $n = 27$  por grupo) y en **(B)** homogenatos de biopsias de

tejido endometrial (n = 27) y de lesiones (n = 41) de pacientes con endometriosis. U.A.: unidades arbitrarias. En el gráfico de box-plot el rectángulo representa el rango de valores comprendidos entre los cuartiles de 25% a 75%, la línea que lo divide representa el valor de la mediana y los corchetes inferiores y superiores representan el valor mínimo y máximo respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas: \* $p < 0.05$  vs endometrio. Las imágenes del panel inferior son representativas de los ensayos de Western blot llevados a cabo para inmunodetectar Gal-1 y  $\beta$ -actina.

A continuación, decidimos evaluar si el grado de severidad de esta patología tiene relación alguna con el incremento observado en la expresión de Gal-1 en las lesiones endometriósicas respecto del tejido endometrial eutópico. Para lo cual, en los casos en los que fue posible basarnos en los criterios de clasificación de la severidad de esta patología establecidos por la ASRM [64], agrupamos por un lado las muestras de biopsias endometriales y lesiones endometriósicas provenientes de pacientes con un grado mínimo y leve de endometriosis (estadios I y II), y por otro lado las de pacientes con un grado moderado y severo de endometriosis (estadios III y IV); luego comparamos mediante un ensayo de Western blot la expresión de Gal-1 entre el endometrio eutópico y las lesiones en cada grupo, como así también en el tejido endometrial o en las lesiones entre ambos grupos.

De esta manera, pudimos determinar que el incremento significativo en los niveles de expresión proteica de Gal-1 observado en las lesiones endometriósicas, comparado con los niveles de expresión en el tejido endometrial, se produce principalmente en las pacientes con un grado de severidad mínimo o leve de endometriosis ( $p = 0.0368$ , **Figura 4.4A**), dado que en las pacientes con un grado moderado o severo de esta patología los niveles de expresión de Gal-1 entre las lesiones y el endometrio eutópico no varían sustancialmente ( $p = 0.5573$ , **Figura 4.4A**). Además, si bien no hallamos diferencias significativas en los niveles de expresión de Gal-1 en el endometrio eutópico entre pacientes con endometriosis mínima y leve respecto de las pacientes con endometriosis moderada y severa ( $p = 0.6582$ , **Figura 4.4B**), es relevante destacar que los niveles de Gal-1 se reducen significativamente en las lesiones de pacientes con endometriosis moderada o severa en comparación con las lesiones de pacientes con endometriosis mínima o leve ( $p = 0.0378$ , **Figura 4.4B**).

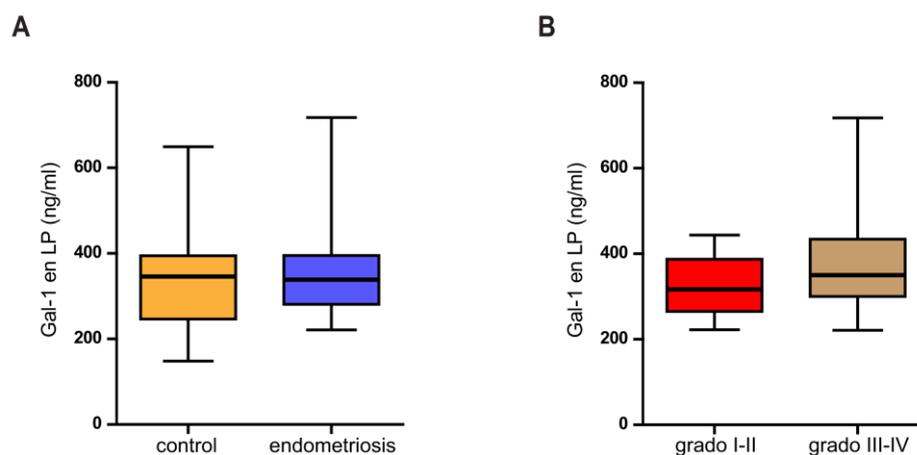


**Figura 4.4. Niveles de expresión proteica de Gal-1 en las lesiones y en el endometrio eutópico de pacientes con diferentes grados de severidad de endometriosis. (A)** Los gráficos comparan los niveles de expresión proteica de Gal-1, determinados por Western blot, entre el tejido endometrial eutópico y las lesiones en pacientes con endometriosis mínima y leve (grados I-II,  $n = 10$  para endometrio y  $n = 15$  para las lesiones) y en pacientes con endometriosis moderada y severa (grados III-IV,  $n = 5$  para endometrio y  $n = 8$  para las lesiones). **(B)** Los gráficos comparan los niveles de expresión proteica de Gal-1 de acuerdo al grado de severidad de la endometriosis en el tejido endometrial eutópico ( $n = 10$  para grados I-II y  $n = 5$  para grados III-IV) y en las lesiones endometriósicas ( $n = 15$  para grados I-II y  $n = 8$  para grados III-IV). U.A.: unidades arbitrarias. En el gráfico de box-plot el rectángulo representa el rango de valores comprendidos entre los cuartiles de 25% a 75%, la línea que lo divide representa el valor de la mediana y los corchetes inferiores y superiores representan el valor mínimo y máximo respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas:  $*p < 0.05$  vs grado I-II.

## NIVELES DE GALECTINA-1 EN EL LÍQUIDO PERITONEAL

Galectina-1 es secretada al espacio intersticial por la mayoría de células que la producen, y en este medio se comporta como un factor soluble dotado de propiedades principalmente inmunomoduladoras y pro-angiogénicas [38,196,197]. Es por tal motivo que decidimos evaluar mediante un ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA) la concentración de esta lectina en el líquido peritoneal de pacientes con distintos grados de endometriosis y en pacientes controles.

Contrario a lo esperado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de Gal-1 en el líquido peritoneal entre pacientes con endometriosis:  $348.5 \pm 20.34$  ng/ml y pacientes controles:  $341.6 \pm 22.39$  ng/ml ( $p = 0.8397$ , **Figura 4.5A**). Como así tampoco se observaron cambios en la concentración de esta lectina en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis mínima y leve en comparación con pacientes que presentan endometriosis moderada y severa ( $p = 0.3295$ , **Figura 4.5B**).

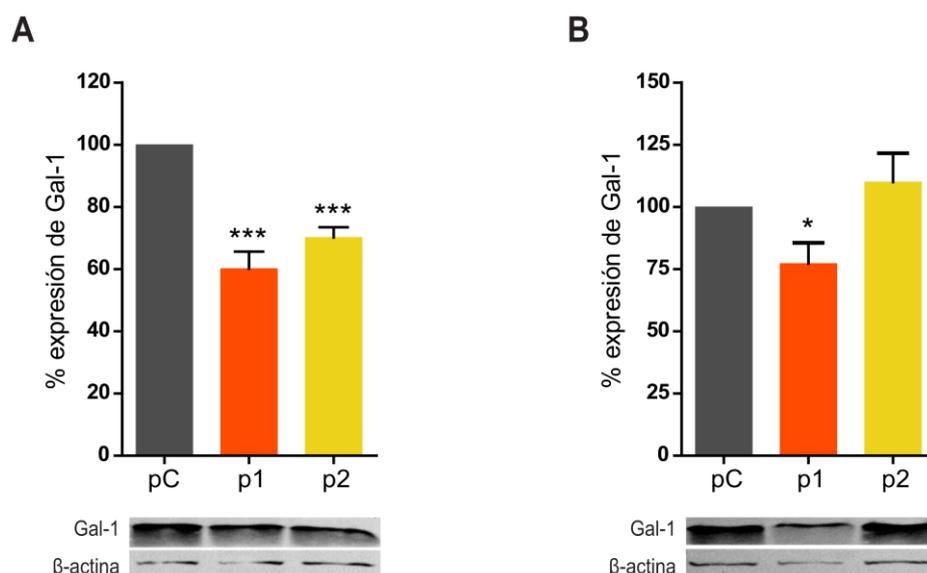


**Figura 4.5. Concentración de Gal-1 en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis y controles.** Los gráficos muestran la concentración de Gal-1 determinada mediante un ensayo de ELISA en (A) el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis ( $n = 26$ ) y de pacientes controles ( $n = 29$ ), y en (B) el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis mínima y leve (grado I-II,  $n = 16$ ) o endometriosis moderada y severa (grado III-IV,  $n = 10$ ). En el gráfico de box-plot el rectángulo representa el rango de valores comprendidos entre los cuartiles de 25% a 75%, la línea que lo divide representa el valor de la mediana y los corchetes inferiores y superiores representan el valor mínimo y máximo respectivamente. LP: líquido peritoneal.

### ***SILENCIAMIENTO TRANSITORIO DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES***

Considerando que las células estromales que conforman las lesiones endometriósicas, y también el tejido endometrial eutópico, expresan selectivamente elevados niveles de Gal-1, nos propusimos silenciar la expresión de esta lectina endógena en cultivos primarios de células estromales endometriales eutópicas de pacientes con endometriosis y de pacientes controles. Para lograr este objetivo utilizamos una técnica de transfección transitoria de las células estromales con dos vectores plasmídicos que codifican cada uno de ellos una secuencia corta de ARN $sh$  diferente, la cual es complementaria a la secuencia ARN mensajero de Gal-1, al cual se unen e impiden que se traduzca en el ribosoma, reduciéndose así los niveles proteicos de esta lectina endógena.

Luego de 72 h de transfección transitoria se observó que ambos vectores de silenciamiento redujeron significativamente la expresión proteica de Gal-1 en los cultivos de células estromales endometriales de pacientes con endometriosis ( $p < 0.001$  vs. vector control, **Figura 4.6A**), lográndose una reducción de un 40% con el vector 1 (p1) y de un 30% con el vector 2 (p2) en relación al vector control (pC) que codifica una secuencia de ARN $sh$  aleatoria que no afecta el transcriptoma celular. Sin embargo, en los cultivos de células estromales endometriales de pacientes controles sólo el vector 1 redujo significativamente la expresión proteica de Gal-1 en un 23% en relación al vector control ( $p < 0.0198$  vs. vector control, **Figura 4.6B**), mientras que el vector 2 no modificó los niveles de expresión de Gal-1 en comparación con los cultivos transfectados con el vector control ( $p > 0.05$  vs. vector control, **Figura 4.6B**).



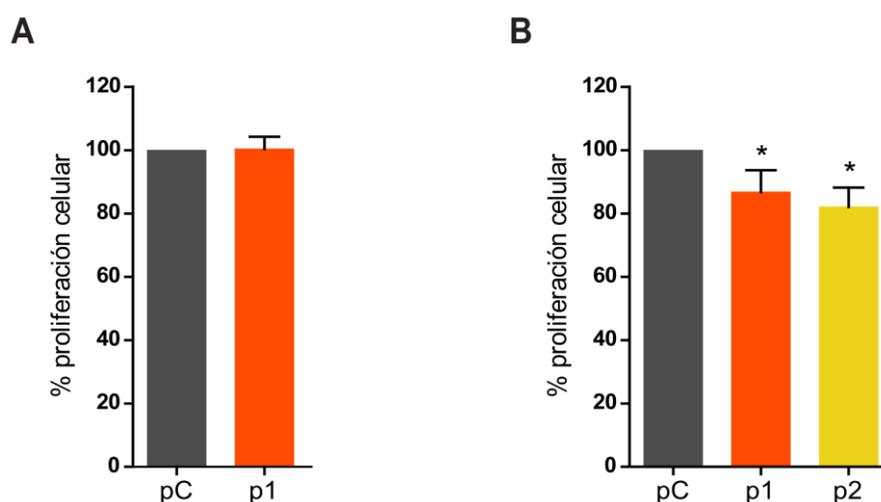
**Figura 4.6. Silenciamiento transitorio de la expresión de Gal-1 en cultivos primarios de células estromales endometriales de pacientes con endometriosis y controles.** Los gráficos muestran los porcentajes de expresión proteica de Gal-1 determinados por Western blot en lisados celulares obtenidos de cultivos primarios de células estromales endometriales de (A) pacientes con endometriosis (n = 5) y (B) pacientes controles (n = 5) tratados por 72 h con los vectores de silenciamiento de Gal-1 (p1 o p2) o con el vector control (pC). Los valores representan la media  $\pm$  1 EEM, y son expresados como porcentajes de expresión relativos al tratamiento con el vector control, establecido como 100%. Los asteriscos indican diferencias significativas: \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs vector control.

### ***EFEECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN IN VITRO DE CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES***

Para dilucidar si la expresión de Gal-1 tiene algún efecto fisiológico sobre las células estromales endometriales, ya sea que éstas provengan de pacientes con endometriosis o de pacientes controles, a continuación evaluamos *in vitro* la tasa de proliferación celular en los cultivos primarios de dichas células, luego de 72 h de transfección transitoria con los vectores de silenciamiento o con el vector control.

Sorprendentemente, si bien la reducción transitoria de la expresión proteica de Gal-1 observada en los cultivos de células estromales de pacientes controles transfectados con el

vector p1 no tiene un efecto aparente sobre la tasa de proliferación celular *in vitro* ( $p = 0.2335$  vs. vector control, **Figura 4.7A**); es importante destacar que la disminución transitoria de la expresión de esta lectina endógena en los cultivos de células estromales de pacientes con endometriosis redujo significativamente la tasa de proliferación celular *in vitro* ( $p = 0.0061$  vs. vector control, **Figura 4.7B**).



**Figura 4.7. Proliferación *in vitro* de células estromales endometriales de pacientes controles o con endometriosis a las que se le silenció en forma transitoria la expresión de Gal-1.** Los gráficos muestran los porcentajes de proliferación celular determinados mediante un ensayo con MTS en cultivos primarios de células estromales endometriales de (A) pacientes controles ( $n = 4$ ) y de (B) pacientes con endometriosis ( $n = 7$ ) tratados por 72 h con los vectores de silenciamiento de Gal-1 (p1 o p2) o con el vector control (pC). Los valores representan la media  $\pm 1$  EEM, y son expresados como porcentajes de proliferación relativos al tratamiento con el vector control, establecido como 100%. Los asteriscos indican diferencias significativas:  $*p < 0.05$  vs vector control.

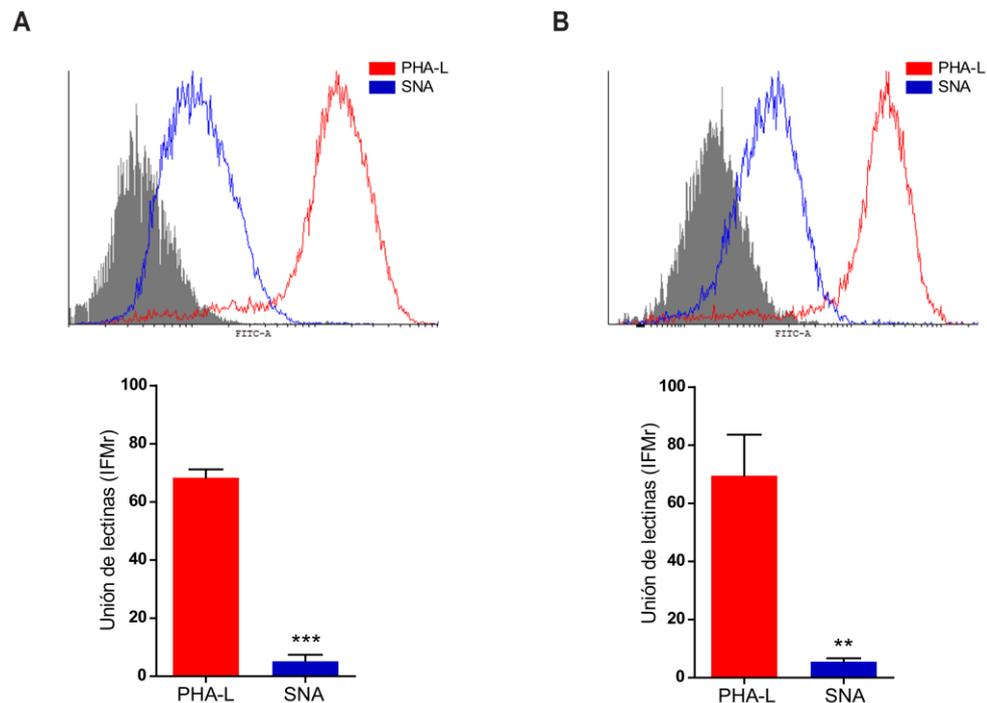
## GLICOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES

Dado que Gal-1 es una lectina endógena que reconoce unidades múltiples del disacárido galactosa- $\beta$ -1-4-*N*-acetilglucosamina (LacNAc) dispuesto principalmente en las ramificaciones de los *N*- y *O*-glicanos complejos presentes en las glicoproteínas de la

superficie celular [197], decidimos evaluar si las células estromales endometriales de pacientes con endometriosis o controles presentan en su superficie celular un glicofenotipo “permisivo” para la unión de Gal-1, el cual podría ser en parte responsable del efecto diferencial de Gal-1 sobre la proliferación de las células endometriales eutópicas de las pacientes con endometriosis.

Para evaluar el glicofenotipo de las células estromales endometriales de pacientes con endometriosis o controles, establecimos cultivos primarios puros de estas células, y luego analizamos mediante un ensayo de citometría de flujo si la dotación de glicanos presentes en su superficie celular son reconocidos por la lectina Fitohemaglutinina-L (PHA-L) que se une a los *N*-glicanos complejos tri- y tetra-antenarios con ramificaciones  $\beta$ -1-6, los cuales también son el blanco de unión para Gal-1; o bien si son reconocidos por la lectina Aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) que se une a los residuos terminales de ácido siálico unidos por enlaces  $\alpha$ -2-6 en *N*- y *O*-glicanos que son refractarios a la unión de Gal-1 [210].

Como puede observarse, la unión de PHA-L a las células estromales endometriales es significativamente mayor que la unión de SNA, tanto en las células aisladas y cultivadas a partir de las biopsias de pacientes controles ( $p < 0.0001$ , **Figura 4.8A**) como de pacientes con endometriosis ( $p = 0.0040$ , **Figura 4.8B**). Sin embargo no se detectaron diferencias significativas si se compara la unión de PHA-L entre las células de pacientes con endometriosis y controles ( $p = 0.9470$ ), como así tampoco para la unión de SNA entre estos grupos ( $p = 0.8862$ ).



**Figura 4.8. Glicofenotipo de células estromales endometriales de pacientes con endometriosis y controles.** Los histogramas del panel superior representan la detección mediante un ensayo de citometría de flujo de las lectinas PHA-L y SNA unidas a la superficie de células estromales endometriales de **(A)** pacientes controles ( $n = 3$ ) y de **(B)** pacientes con endometriosis ( $n = 4$ ). El histograma color gris representa el control negativo sin tratamiento con las lectinas. Los gráficos del panel inferior muestran el grado de unión de estas lectinas (determinado como la intensidad de fluorescencia media relativa = IFMr) a sus respectivos glicanos en la superficie celular. Los valores representan la media  $\pm 1$  EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas: \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs PHA-L.

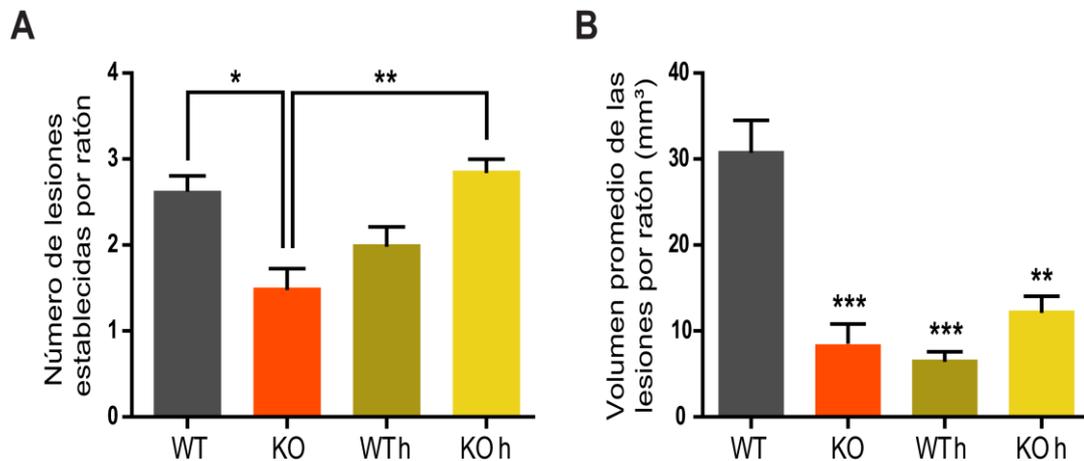
## RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL MODELO MURINO DE ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL

### ***EFFECTO DE GALECTINA-1 SOBRE EL CRECIMIENTO IN VIVO DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS MURINAS***

En principio se evaluó el efecto de Gal-1 sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en ratones hembra C57BL/6 adultos. Para lo cual se realizó un trasplante autólogo de 3 fragmentos de cuerno uterino al mesenterio intestinal en ratones de tipo salvaje (grupo WT) o en ratones genéticamente modificados: *Lgals1*<sup>-/-</sup> (grupo KO), los cuales no expresan Gal-1 en todo el organismo. Asimismo, para evaluar la contribución parcial de Gal-1 en el desarrollo de las lesiones endometriósicas, ya sea que esta lectina se encuentre exclusivamente en la lesión y no en el ambiente peritoneal, o viceversa, se realizaron trasplantes heterólogos de fragmentos de tejido uterino de ratones KO donantes al mesenterio de ratones WT receptores singeneicos (grupo WTh), o bien desde ratones WT donantes al mesenterio de ratones KO receptores singeneicos (grupo KOH). Luego de 4 semanas de realizar la inducción quirúrgica de endometriosis experimental en este modelo murino, se sacrificaron los animales y se procedió a contar el número de lesiones establecidas, a las cuales se les midió su diámetro mayor y menor para calcular su volumen aplicando la fórmula:  $V = (\frac{3}{4}) \pi r^2 R$ , donde  $r < R$  [170,227-229].

El promedio de lesiones establecidas por ratón fue de  $2.6 \pm 0.16$  para el grupo WT,  $1.5 \pm 0.70$  para el KO,  $2.0 \pm 0.67$  para el WTh y  $2.9 \pm 0.38$  para el KOH; y como puede observarse disminuyó de forma estadísticamente significativa en el grupo KO en comparación con los grupos WT y KOH ( $p = 0.001$ , **Figura 4.9A**). Además, es importante resaltar que el tamaño de las lesiones, representado por el volumen de las mismas, se redujo significativamente en los grupos KO, WTh y KOH en comparación con los ratones WT, correspondiendo esta disminución a un 72.6%, 78.3% y 59.7% respectivamente ( $p < 0.0001$ , **Figura 4.9B**). Este resultado pone de manifiesto la relevancia fisiopatológica de Gal-1 en el

establecimiento y desarrollo de tejido endometrial ectópico, al menos en este modelo murino de endometriosis experimental.



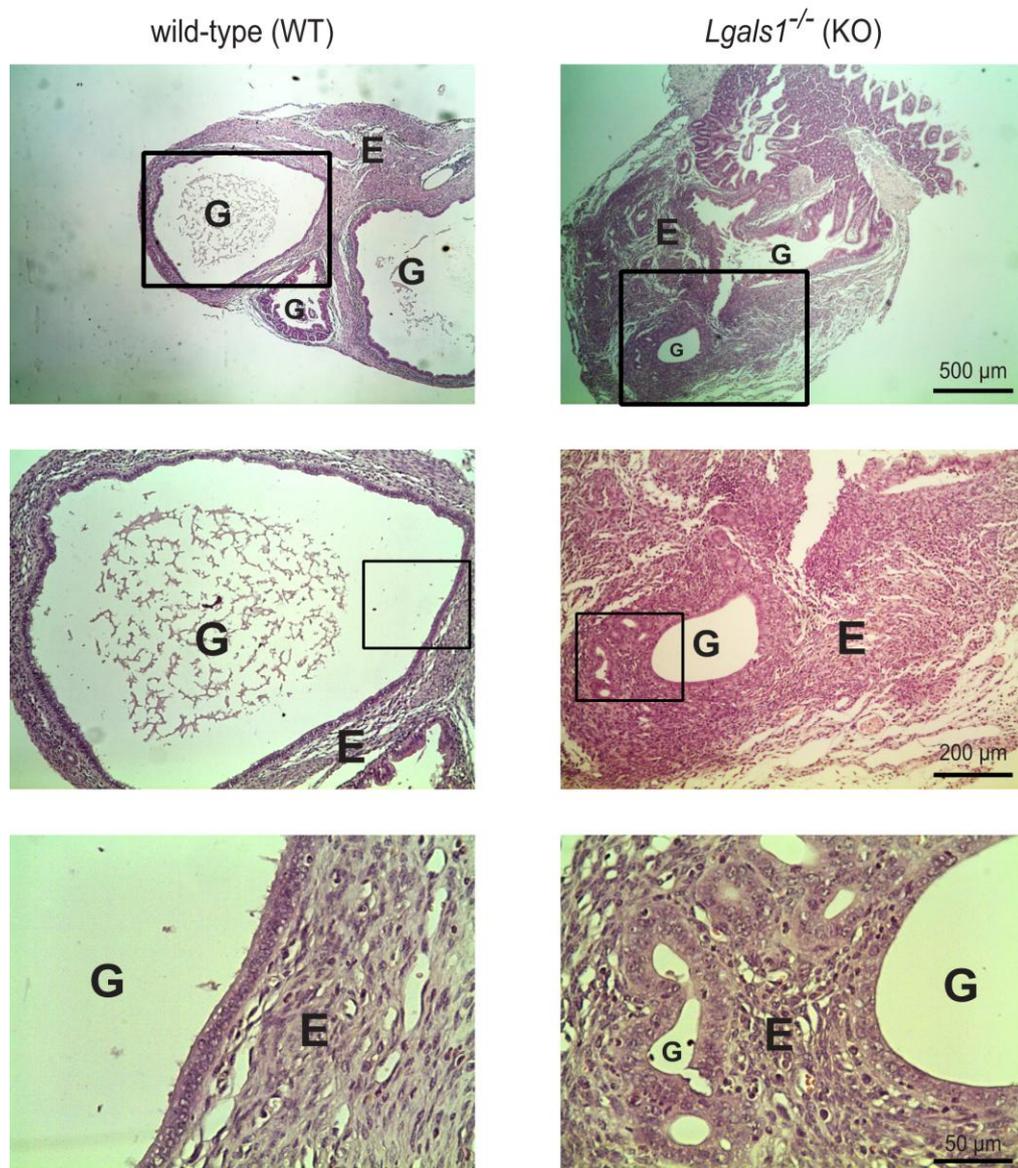
**Figura 4.9. Número y tamaño de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en ratones.** Los gráficos muestran (A) el número de lesiones desarrolladas por ratón y (B) el volumen promedio de las lesiones por ratón. Para los grupos WT, KO y WTh (n = 10) y para el grupo KOh (n = 7). Los valores representan la media  $\pm$  1 EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

### ***EFFECTO DE GALECTINA-1 SOBRE LA ARQUITECTURA HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS MURINAS***

Para evaluar si Gal-1 tiene algún efecto sobre la arquitectura histológica de las lesiones endometriósicas, realizamos una coloración estándar con hematoxilina-eosina en cortes histológicos de las lesiones inducidas experimentalmente en los grupos autólogos WT y KO.

Como puede observarse, el análisis histológico cualitativo de las lesiones demuestra que la presencia (grupo WT) o la ausencia (grupo KO) de Gal-1 en las lesiones no tiene como consecuencia ningún efecto aparente en su estructura histológica, dado que en ambos grupos experimentales las lesiones presentan las características típicas y representativas que

las definen como tal, y éstas son las glándulas secretoras tapizadas por un epitelio cúbico simple o cilíndrico rodeadas de un estroma celular compacto o laxo (**Figura 4.10**).

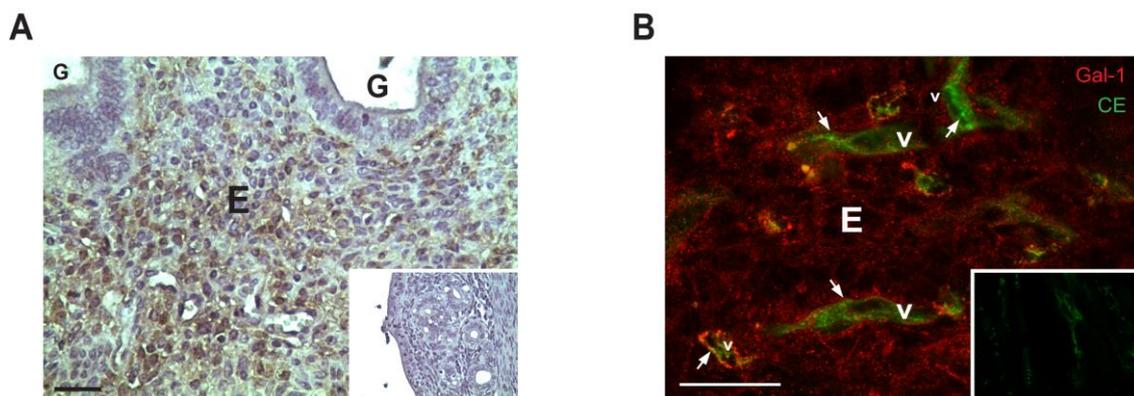


**Figura 4.10.** Arquitectura histológica de las lesiones endometriósicas inducidas en los grupos experimentales autólogos WT y KO. Las microfotografías son representativas de cortes histológicos de lesiones endometriósicas tratadas con hematoxilina-eosina (n = 5 por grupo). Los recuadros representan la región del corte histológico presentado en la imagen de mayor magnificación. Las barras indican la escala de tamaño. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico.

## LOCALIZACIÓN HISTOLÓGICA DE GALECTINA-1 EN LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS MURINAS

Teniendo en cuenta el patrón de expresión tisular de Gal-1 en lesiones endometriósicas humanas que analizamos anteriormente, decidimos evaluar mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia el patrón de expresión tisular de esta lectina en las lesiones endometriósicas de nuestro modelo experimental murino.

Como podemos observar en el ensayo de inmunohistoquímica, Gal-1 se expresa exclusivamente en el compartimento estromal de la lesión, no observándose expresión de dicha lectina en el epitelio glandular (**Figura 4.11A**). Asimismo, mediante su detección por inmunofluorescencia puede observarse una intensa expresión de Gal-1 en las células estromales de la lesión, y aunque con menor intensidad pero igualmente positiva, también se observa la expresión de Gal-1 en las células endoteliales que forman parte de los vasos sanguíneos que irrigan la lesión (**Figura 4.11B**), los cuales se marcaron inyectando en el torrente sanguíneo de los animales la lectina *Lycopersicon esculentum* conjugada con fluoresceína. Esta lectina derivada del tomate, reconoce y se une a determinados grupos de glicanos presentes en las glicoproteínas de la superficie celular de las células endoteliales [230].



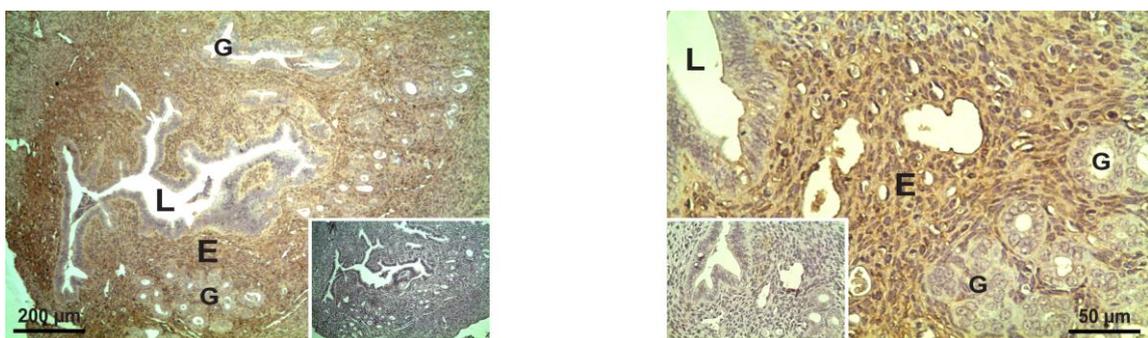
**Figura 4.11. Patrón de expresión histológica de Gal-1 en las lesiones endometriósicas murinas.** Las microfotografías son representativas de la localización histológica de Gal-1 en las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en ratones WT (n = 3). (A) Ensayo de inmunohistoquímica y (B) de inmunofluorescencia indirecta. Barras de escala: 30  $\mu$ m en A y 75  $\mu$ m en B. Insertos: controles negativos sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma

endometriósico, v: vasos sanguíneos. CE: células endoteliales. Las flechas señalan la expresión de Gal-1 en las CE marcadas con la lectina *Lycopersicon esculentum*.

### **LOCALIZACIÓN HISTOLÓGICA DE GALECTINA-1 EN EL TEJIDO ENDOMETRIAL MURINO**

Para evaluar el patrón de expresión tisular de Gal-1 en el tejido uterino de ratón y cotejarlo con el patrón observado en las lesiones murinas, o en las lesiones y en el endometrio humano, realizamos un ensayo de inmunohistoquímica en iguales condiciones al realizado para determinar la localización tisular de Gal-1 en las lesiones endometriósicas murinas.

Al igual que el patrón de expresión tisular de Gal-1 observado en las lesiones endometriósicas murinas, como así también en las lesiones y en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, esta lectina endógena se expresa exclusivamente en el estroma del tejido endometrial murino, dado que no se inmunodetectó su presencia en las células epiteliales glandulares o luminales que forman parte de dicho tejido (**Figura 4.12**).

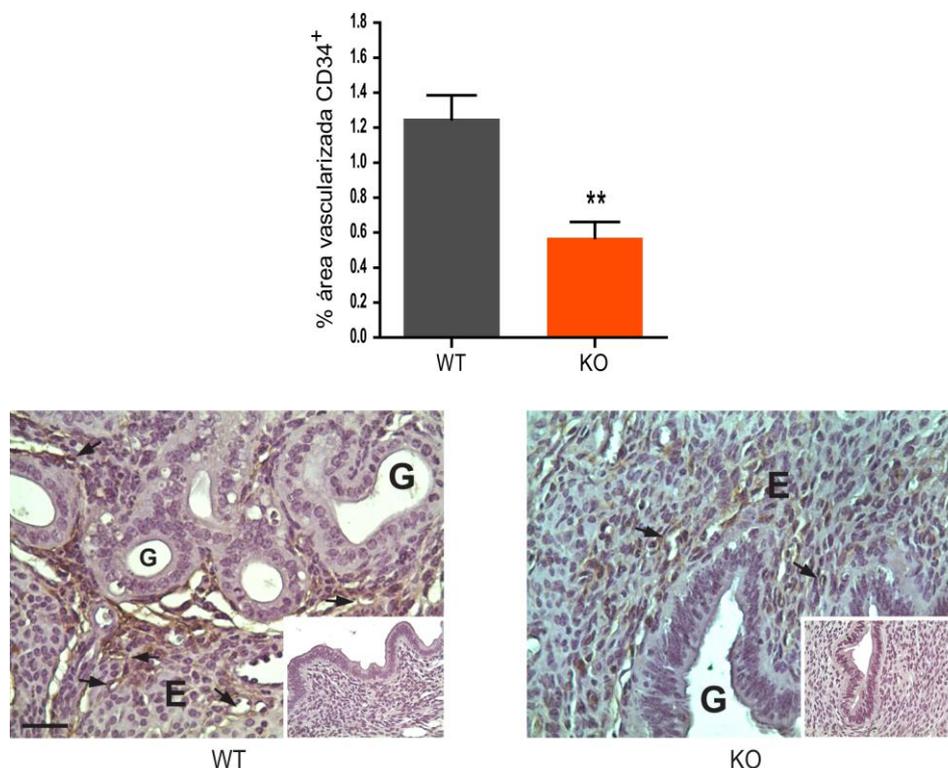


**Figura 4.12. Patrón de expresión histológica de Gal-1 en el tejido endometrial murino.** Las microfotografías son representativas de un ensayo de inmunohistoquímica para detectar la expresión Gal-1 en el tejido endometrial de ratones WT (n = 3). Insertos: controles negativos sin el anticuerpo primario. Las barras indican la escala de tamaño. L: lumen endometrial, G: glándula endometrial, E: estroma endometrial.

## ***GALECTINA-1 PROMUEVE EL DESARROLLO VASCULAR IN VIVO DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS MURINAS***

Teniendo en cuenta la expresión de Gal-1 en el endotelio de las lesiones endometriósicas humanas o murinas, y sumado a esto, la comprobada capacidad que tiene esta lectina de promover el desarrollo angiogénico en tumores de diversa naturaleza [208,225]; decidimos estudiar el efecto potencial de Gal-1 en el desarrollo vascular de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en el modelo murino. Para tal fin, comenzamos evaluando el porcentaje de área vascularizada de las lesiones endometriósicas mediante una técnica de inmunohistoquímica a partir de la cual identificamos los vasos sanguíneos con el marcador endotelial CD34.

Como puede observarse, el porcentaje de área vascularizada inmunomarcada para CD34 en las lesiones endometriósicas se reduce significativamente en el grupo de ratones deficientes de Gal-1 (grupo KO) en comparación con el grupo WT ( $p = 0.002$ , **Figura 4.13**).



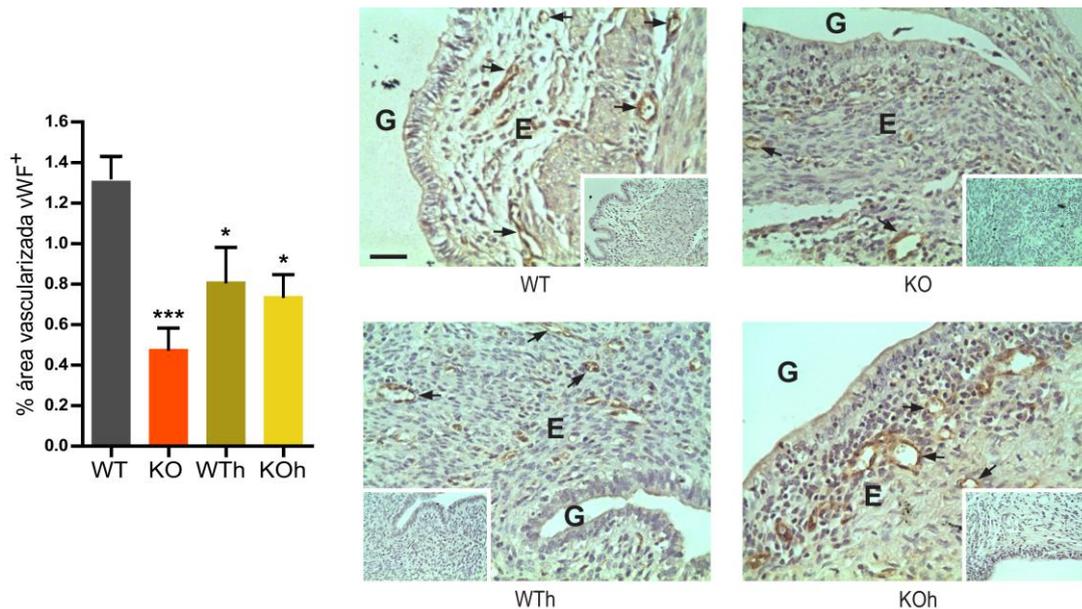
**Figura 4.13. Efecto de Gal-1 en la vascularización de las lesiones endometriósicas murinas.**

En el gráfico se representa el porcentaje de área vascular inmunomarcada con CD34 en las lesiones inducidas experimentalmente en el grupo WT (n = 7) y en el grupo KO (n = 6). Los valores

representan la media  $\pm$  1 EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas:  $**p < 0.01$  vs WT. Las microfotografías son representativas de los ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Inserto: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. Las flechas señalan los vasos sanguíneos marcados para CD34.

Este resultado si bien pone de manifiesto la relevancia fisiopatológica de Gal-1 al promover el desarrollo vascular de las lesiones endometriósicas, también puede resultar un tanto controversial si se considera que CD34 no es un marcador exclusivo de células endoteliales, dado que también puede ser expresado por otras estirpes celulares como células progenitoras hematopoyéticas y por algunos leucocitos que podrían estar infiltrando las lesiones endometriósicas [231]. Para evitar tal controversia y corroborar el resultado obtenido, a continuación evaluamos en los 4 grupos experimentales el porcentaje de área vascularizada mediante una técnica de inmunohistoquímica utilizando un marcador específico de células endoteliales: el Factor de von Willebrand (vWF) [232].

En correspondencia con el resultado observado en las lesiones inmunomarcadas previamente con CD34, el porcentaje de área vascular inmunomarcada con el vWF en las lesiones endometriósicas se redujo significativamente en los grupos KO, WTh y KOH en comparación con el grupo de ratones WT, en una magnitud relativa de: 63.5%, 38.0% y 43.5% respectivamente ( $p < 0.0005$ , **Figura 4.14**).



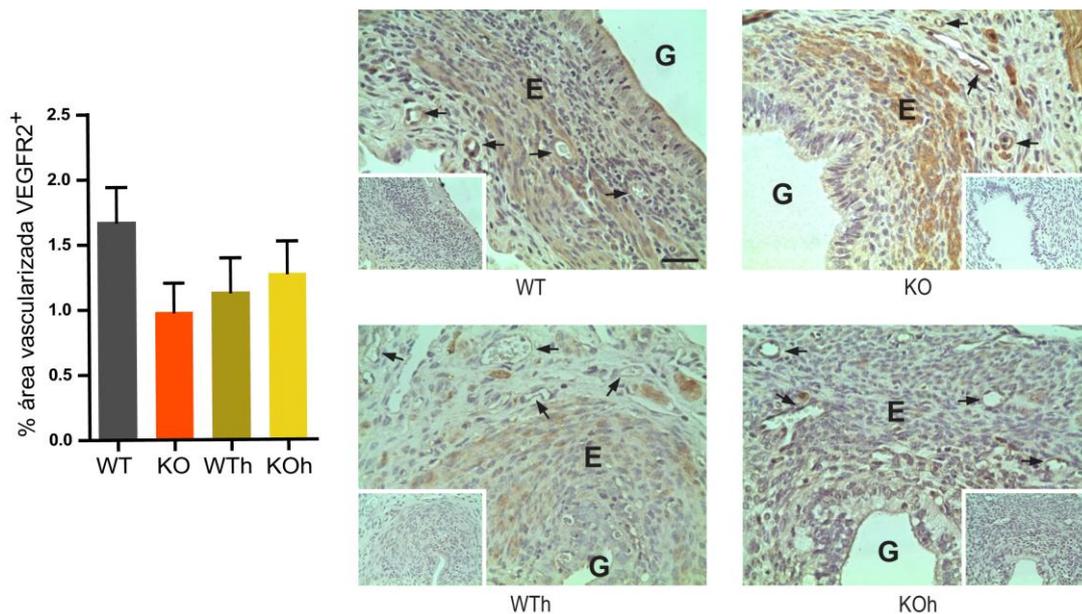
**Figura 4.14. Efecto de Gal-1 en la vascularización de las lesiones endometriósicas.** En el gráfico se representa el porcentaje de área vascular inmunomarcada para el vWF (n = 6-8 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  1 EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas: \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  vs WT. Las microfotografías son representativas de los ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Insertos: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. Las flechas señalan los vasos sanguíneos inmunomarcados para el vWF.

### ***ANÁLISIS DE LOS FACTORES PRO-ANGIOGÉNICOS VEGF Y CXCL2-KC EN EL MODELO MURINO DE ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL***

Para investigar si otro factor pro-angiogénico por excelencia, como el VEGF [211], tiene algún efecto en la reducción de la vascularización observada en las lesiones endometriósicas correspondientes a los ratones que carecen completamente (grupo KO) o parcialmente (grupos WTh y KOH) de Gal-1; decidimos evaluar mediante una técnica de inmunohistoquímica la distribución histológica de VEGF en las lesiones endometriósicas de los diferentes grupos experimentales. También evaluamos mediante una técnica de inmunohistoquímica el porcentaje de área vascular inmunomarcada para el receptor canónico de tipo 2 de VEGF (VEGFR2) en las lesiones [133], y finalmente determinamos la



Asimismo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados en cuanto al porcentaje de área vascular inmunomarcada para VEGFR2 en las lesiones endometriósicas murinas ( $p = 0.2660$ , **Figura 4.16**). Cabe mencionar que en todos los grupos experimentales observamos que las células estromales y epiteliales también expresan el VEGFR2.



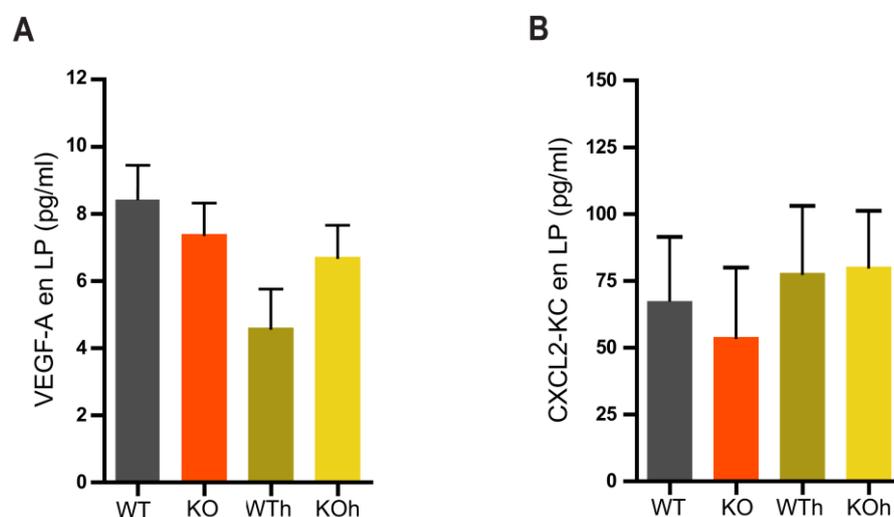
**Figura 4.16. Expresión vascular del receptor tipo 2 de VEGF (VEGFR2) en las lesiones murinas.** En el gráfico se representa el porcentaje de área vascular inmunomarcada para VEGFR2 ( $n = 6-8$  por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  1 EEM. Las microfotografías son representativas de los ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Insertos: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. Las flechas señalan los vasos sanguíneos inmunomarcados para VEGFR2.

Al igual que lo observado en lo respectivo a la distribución histológica de VEGF y la expresión vascular de su receptor de tipo 2 en las lesiones endometriósicas, tampoco existen diferencias significativas en las concentraciones de VEGF-A en el líquido peritoneal entre los diferentes grupos experimentales ( $p = 0.1130$ , **Figura 4.17A**).

Por otro lado, considerando que VEGF no es el único factor pro-angiogénico relevante, también se evaluó mediante un ensayo de ELISA la concentración de la citoquina

pro-angiogénica murina CXCL2-KC en el líquido peritoneal de los ratones. Se ha reportado que esta citoquina tiene un papel relevante en la angiogénesis murina inducida por procesos de tipo inflamatorios [233]. Este factor pro-angiogénico murino es un análogo funcional de la IL-8 humana, sobre la cual se ha demostrado que desempeña un rol esencial en los procesos angiogénicos involucrados en la fisiopatología de la endometriosis [176,234].

Al igual que VEGF-A, tampoco se observaron alteraciones significativas en la concentración peritoneal de este factor pro-angiogénico murino entre los grupos experimentales estudiados ( $p = 0.6099$ , **Figura 4.17B**).



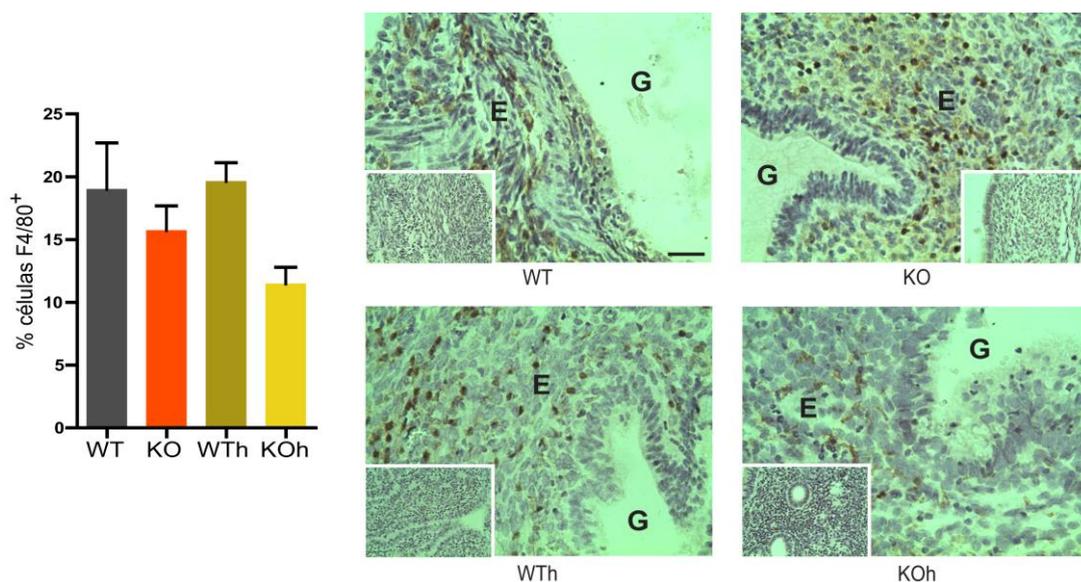
**Figura 4.17. Concentración de los factores pro-angiogénicos VEGF-A y CXCL2-KC en el líquido peritoneal murino.** En los gráficos se representan las concentraciones de (A) VEGF-A ( $n = 7-10$  por grupo) y (B) CXCL2-KC ( $n = 6-7$  por grupo) en el líquido peritoneal murino, determinadas mediante ensayos de ELISA. Los valores representan la media  $\pm 1$  EEM. LP: líquido peritoneal.

Estos resultados novedosos sugieren convincentemente que el efecto pro-angiogénico sustancial que tiene Gal-1 en el desarrollo vascular de las lesiones endometriósicas se produce de manera independiente al efecto angiogénico mediado por VEGF y CXCL2-KC, al menos en este modelo murino de endometriosis experimental.

## INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS MURINAS

Teniendo en cuenta que además de su rol pro-angiogénico, Gal-1 también es un factor inmunomodulador sumamente importante en diversas patologías [235], decidimos evaluar si la presencia de esta lectina (grupo WT), o bien su ausencia en todo el organismo (grupo KO), en la lesión (grupo WTh), o en el ambiente peritoneal (grupo KOh), tiene algún efecto sobre la infiltración de las lesiones por los macrófagos. Como ya se mencionó en la introducción, los macrófagos representan la principal población de células inmunológicas involucradas en la fisiopatología de la endometriosis [98], y en particular en promover el desarrollo angiogénico de las mismas tal como se corroboró en un modelo murino de endometriosis experimental similar al utilizado en este trabajo de tesis [173]. Por tal motivo realizamos un ensayo de inmunohistoquímica para determinar el porcentaje de macrófagos infiltrantes, los cuales se identificaron inmunodetectando la expresión de un marcador ampliamente reportado para reconocer esta estirpe celular: F4/80 [236].

Como resultado de este análisis se determinó que el porcentaje de macrófagos que infiltran las lesiones endometriósicas murinas no muestra cambios significativos entre los diversos grupos experimentales estudiados ( $p > 0.05$ , **Figura 4.18**).



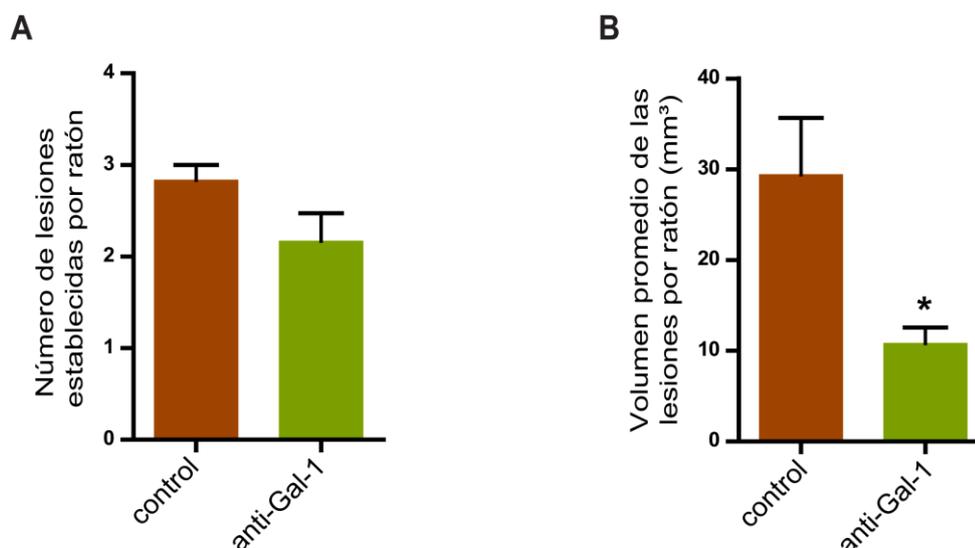
**Figura 4.18. Infiltración de macrófagos en las lesiones endometriósicas murinas.** En el gráfico se representa el porcentaje de células inmunomarcadas con el marcador de macrófagos F4/80 ( $n = 6-7$  por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  1 EEM. Las microfotografías son

representativas de los ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . Insertos: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. Las células inmunomarcadas se ven de color marrón.

### ***EFFECTO DEL BLOQUEO DE GALECTINA-1 EN LA CAVIDAD PERITONEAL SOBRE EL CRECIMIENTO IN VIVO DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS MURINAS***

En un futuro la inhibición de los procesos fisiopatológicos mediados por Gal-1 podría conducir al desarrollo de una potencial estrategia terapéutica que les permita a las mujeres afectadas por esta patología limitar la progresión de la enfermedad y atenuar su sintomatología. Es por tal motivo que en este trabajo de tesis doctoral decidimos evaluar si el bloqueo específico de Gal-1 en la cavidad peritoneal reduce el tamaño de las lesiones endometriósicas murinas. Para ello, hicimos uso de un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-Gal-1, denominado F8.G7 [237], el cual demostró tener efectos anti-angiogénicos significativos sobre la vasculatura tumoral [210,225]. Este anticuerpo se inyectó 2 veces por semana por vía intraperitoneal en dosis de 15 mg/kg en ratones hembra C57BL/6 wild-type a los cuales se les indujeron previamente lesiones endometriósicas. En forma paralela se inyectó a otro grupo de ratones en iguales condiciones con la misma dosis de IgG de ratón como control de isotipo. En ambos grupos, el tratamiento se llevo a cabo desde la segunda semana post-inducción de la endometriosis hasta la cuarta semana, momento en el cual los animales se sacrificaron.

Como podemos observar, el bloqueo específico de Gal-1 en la cavidad peritoneal de los ratones tratados con el anticuerpo neutralizante F8.G7 (grupo anti-Gal-1) no disminuyó el número de lesiones establecidas por ratón ( $p = 0.1004$ , **Figura 4.19A**) en comparación con los ratones que recibieron una dosis igual de IgG (grupo control). Sin embargo, es muy importante destacar que el tamaño promedio de las lesiones, representado por su volumen, se redujo significativamente en un 63,2% en el grupo de ratones tratados con el anticuerpo neutralizante anti-Gal-1 en comparación con los ratones del grupo control ( $p = 0.0148$ , **Figura 4.19B**).



**Figura 4.19. Efecto del bloqueo de Gal-1 a nivel peritoneal en el número y tamaño de las lesiones endometriósicas en ratones tratados con el anticuerpo neutralizante F8.G7.** Los gráficos muestran (A) el número de lesiones desarrolladas por ratón y (B) el volumen promedio de las lesiones por ratón en ambos grupos experimentales (n = 6). Los valores representan la media  $\pm$  1 EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas: \* $p < 0.05$  vs control.

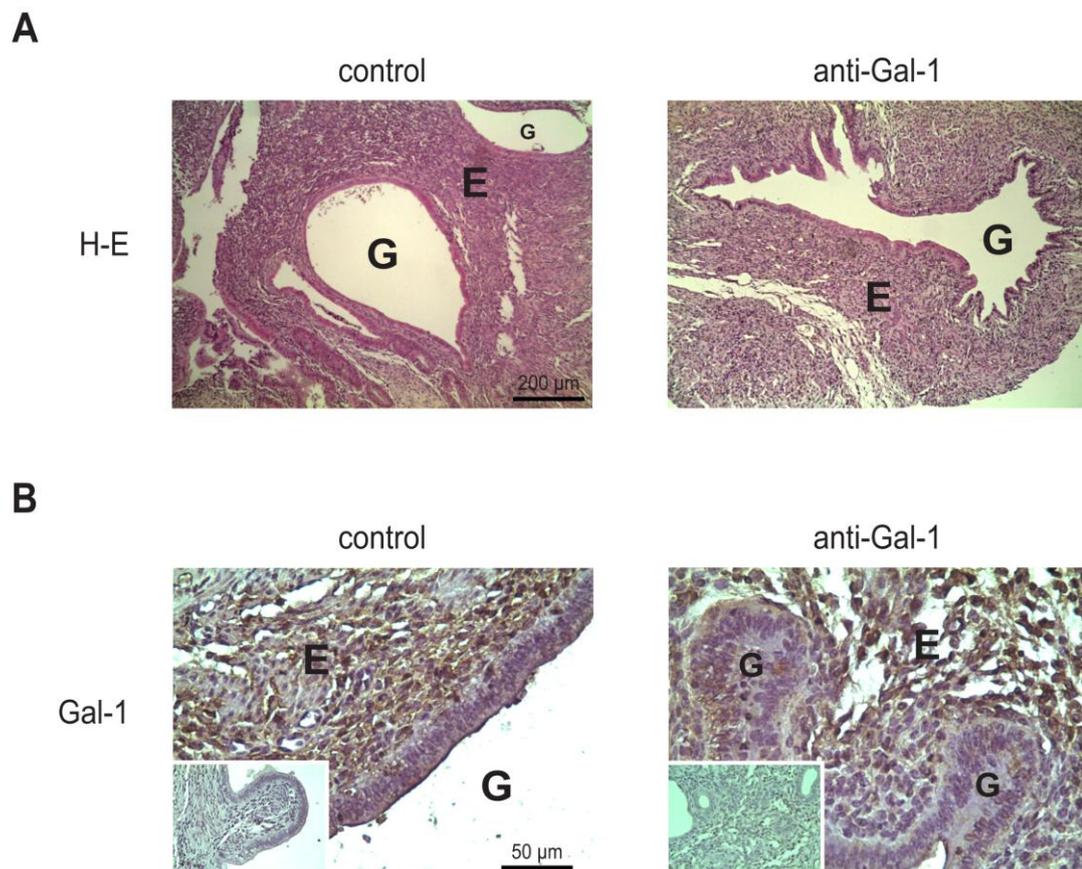
Este resultado confirma la importancia fisiopatológica que tiene Gal-1 promoviendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas *in vivo*, y pone de manifiesto los beneficios terapéuticos potenciales que podrían derivarse del hecho de bloquear el efecto de esta lectina a nivel peritoneal para mitigar la severidad de la endometriosis.

#### ***EFFECTO DEL BLOQUEO DE GALECTINA-1 EN LA CAVIDAD PERITONEAL SOBRE LA ARQUITECTURA HISTOLÓGICA Y EXPRESIÓN TISULAR DE ESTA LECTINA EN LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS MURINAS***

Para evaluar si el bloqueo de Gal-1 a nivel peritoneal tiene algún efecto sobre la arquitectura histológica de las lesiones endometriósicas o bien sobre la distribución tisular de esta lectina en dichas lesiones, realizamos una coloración estándar con hematoxilina-eosina y una inmunohistoquímica para detectar Gal-1, en cortes histológicos de lesiones

endometriósicas inducidas experimentalmente en el grupo de ratones tratados con el anticuerpo neutralizante F8.G7 como así también en ratones del grupo control.

Luego de realizar un análisis histológico cualitativo, se observó que el tratamiento con el anticuerpo neutralizante de Gal-1 no tiene como consecuencia ningún efecto aparente sobre la estructura histológica de las lesiones endometriósicas (**Figura 4.20A**). Además, tal como se observó anteriormente en los grupos autólogos y heterólogos, también en estos dos grupos experimentales puede observarse que Gal-1 se expresa en el compartimento estromal de la lesión, pero no se expresa en el epitelio glandular en ninguno de los dos grupos estudiados (**Figura 4.20B**). Estos resultados nuevamente reflejan el patrón de expresión tisular de Gal-1 observado anteriormente en las lesiones humanas (Figura 4.1).



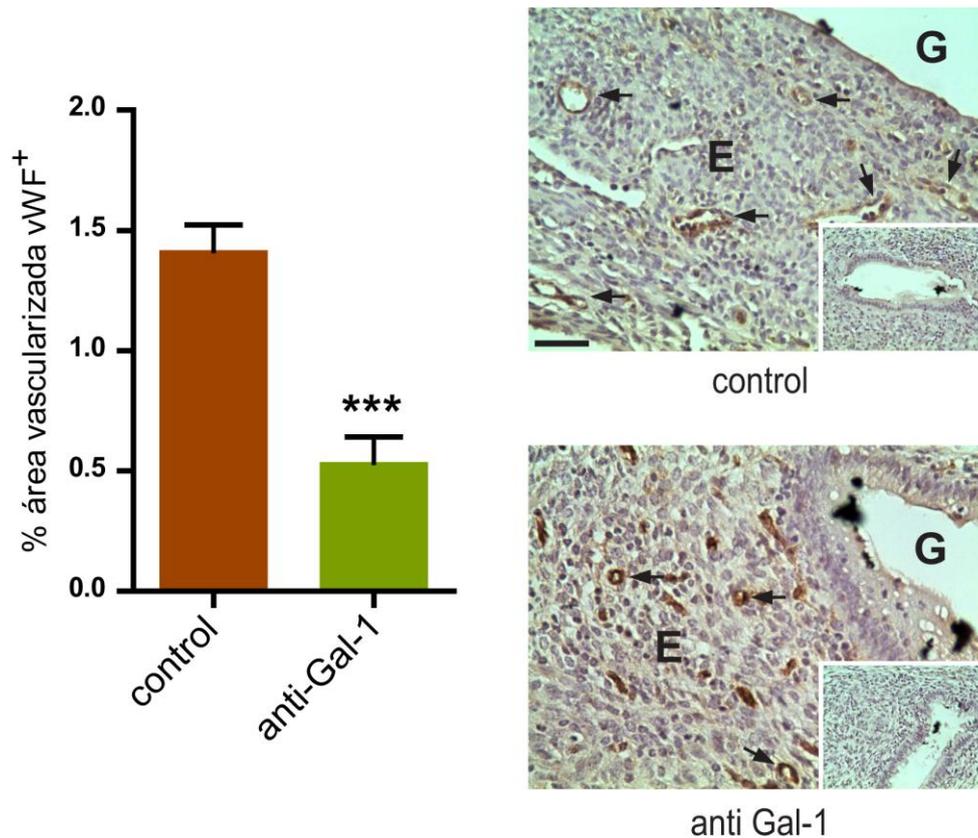
**Figura 4.20. Análisis histológico de las lesiones endometriósicas de los ratones tratados con el anticuerpo neutralizante de Gal-1 (F8.G7) y de los ratones del grupo control.** Las microfotografías son representativas de cortes histológicos de lesiones endometriósicas (**A**) tratados con hematoxilina-eosina o (**B**) inmunomarcados para Gal-1 en ambos grupos experimentales (n = 3

por grupo). Las barras indican la escala de tamaño. Insertos: controles negativos sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. H-E: hematoxilina-eosina.

### ***EFECTO DEL BLOQUEO DE GALECTINA-1 EN LA CAVIDAD PERITONEAL SOBRE LA VASCULARIZACIÓN DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS MURINAS***

En base a la manifiesta relevancia fisiopatológica que demostró tener la presencia de Gal-1 en el desarrollo de la vasculatura endometriósica, a continuación estudiamos el efecto que tiene el bloqueo selectivo de esta lectina en la cavidad peritoneal utilizando el anticuerpo neutralizante F8.G7 sobre el desarrollo de la red vascular en las lesiones. Para ello, evaluamos el porcentaje de área vascularizada de las lesiones realizando una inmunohistoquímica para marcar los vasos sanguíneos con un anticuerpo anti-vWF.

Determinamos así que el porcentaje de área vascular inmunomarcada para vWF se reduce significativamente en un 62,3% en las lesiones endometriósicas de los ratones tratados con el anticuerpo neutralizante anti-Gal-1 en comparación con los ratones tratados con el control de isotipo ( $p = 0.0003$ , **Figura 4.21**).



**Figura 4.21. Efecto del bloqueo específico de Gal-1 a nivel peritoneal en la vascularización de las lesiones endometriósicas murinas.** En el gráfico se representa el porcentaje de área vascular inmunomarcada para el vWF (n = 5-6 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  1 EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas: \*\*\* $p < 0.001$  vs control. Las microfotografías son representativas de los ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Insertos: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. Las flechas señalan los vasos sanguíneos inmunomarcados para el vWF.

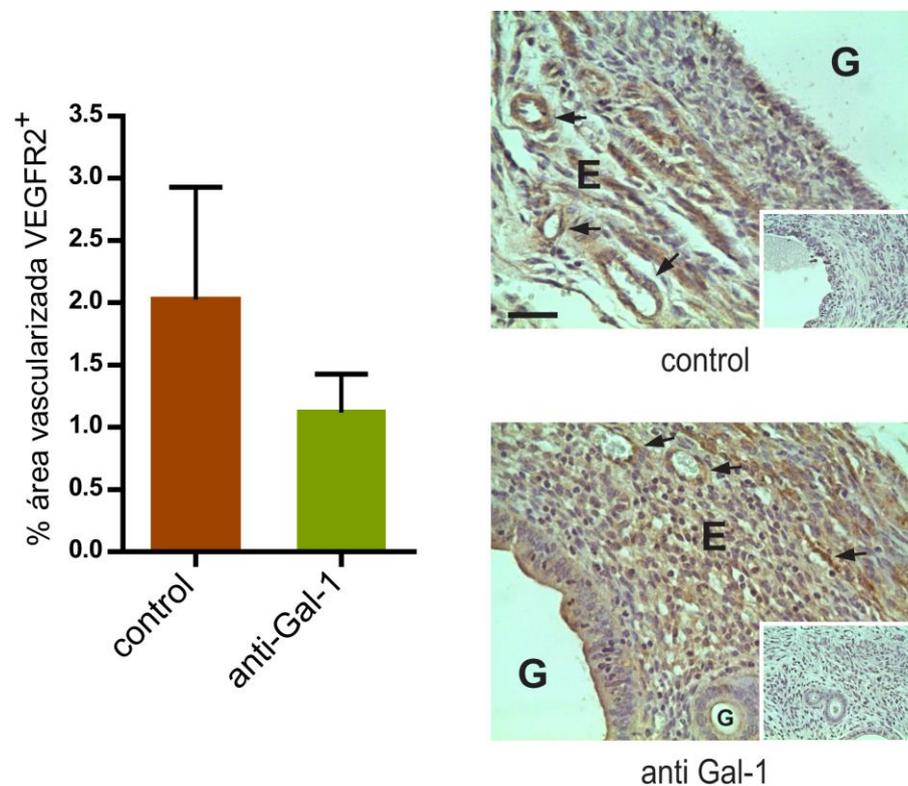
### ***EFEECTO DEL BLOQUEO DE GALECTINA-1 EN LA CAVIDAD PERITONEAL SOBRE LOS FACTORES PRO-ANGIOGÉNICOS VEGF Y CXCL2-KC***

Para investigar si el bloqueo de Gal-1 en la cavidad peritoneal tiene algún efecto sobre la expresión y secreción de otros factores pro-angiogénicos involucrados en la fisiopatología de la endometriosis, a continuación utilizando una técnica de inmunohistoquímica evaluamos la distribución histológica de VEGF en las lesiones



representativas de los ensayos de inmunohistoquímica para VEGF en las lesiones murinas ( $n = 3$  por grupo). Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ . Insertos: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico.

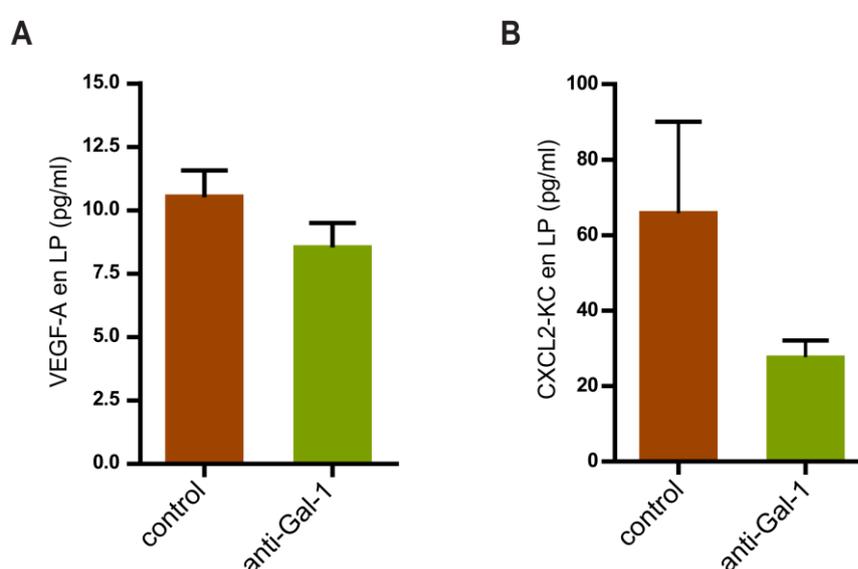
En correspondencia con este resultado, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados respecto al porcentaje de área vascular inmunomarcada para VEGFR2 en las lesiones endometriósicas ( $p = 0.3235$ , **Figura 4.23**). Como puede observarse, las células estromales y las epiteliales también expresan VEGFR2 en ambos grupos experimentales.



**Figura 4.23. Expresión vascular del VEGFR2 en las lesiones de los ratones tratados con el anticuerpo F8.G7 o con el anticuerpo control.** En el gráfico se representa el porcentaje de área vascular inmunomarcada para VEGFR2 ( $n = 4-5$  por grupo). Los valores representan la media  $\pm 1$  EEM. Las microfotografías son representativas de los ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ . Insertos: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. Las flechas señalan los vasos sanguíneos inmunomarcados para VEGFR2.

Al igual que lo observado en relación a la distribución histológica de VEGF y la expresión vascular de su receptor de tipo 2, tampoco hubo diferencias sustanciales entre ambos grupos experimentales en las concentraciones de VEGF-A en el líquido peritoneal ( $p = 0.1574$ , **Figura 4.24A**).

Además, se evaluó la concentración de la citoquina CXCL2-KC en el líquido peritoneal de los ratones mediante un ensayo de ELISA, y no se observaron cambios significativos en la concentración peritoneal de este factor pro-angiogénico murino entre ambos grupos experimentales ( $p = 0.1526$ , **Figura 4.24B**).



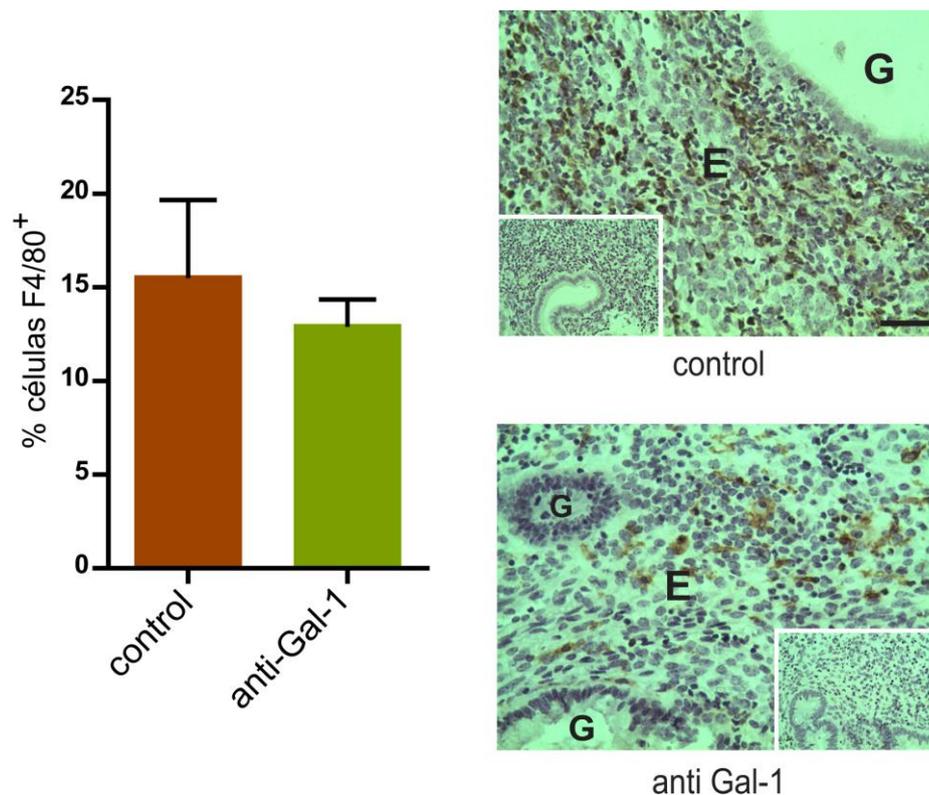
**Figura 4.24. Concentración de los factores pro-angiogénicos VEGF y CXCL2-KC en líquido peritoneal de los ratones tratados con el anticuerpo F8.G7 o con el anticuerpo control.** En los gráficos se representan las concentraciones en el líquido peritoneal de (A) VEGF-A ( $n = 6$  por grupo) y (B) CXCL2-KC ( $n = 4-5$  por grupo) determinadas mediante un ensayo de ELISA. Los valores representan la media  $\pm 1$  EEM. LP: líquido peritoneal.

### ***EFECTO DEL BLOQUEO DE GALECTINA-1 EN LA CAVIDAD PERITONEAL SOBRE LA INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN LAS LESIONES ENDOMETRIÓNICAS MURINAS***

Finalmente, evaluamos si el bloqueo de Gal-1 inyectando el anticuerpo F8.G7 en la cavidad peritoneal murina tiene algún efecto sobre la infiltración de las lesiones por los

macrófagos. Para ello, se llevo a cabo un ensayo de inmunohistoquímica en el que se identificó a los macrófagos infiltrantes mediante el marcador F4/80.

Al igual que lo determinado anteriormente en los grupos autólogos y heterólogos, tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos que infiltraron las lesiones endometriósicas murinas entre el grupo de ratones tratados con el anticuerpo anti-Gal-1 en comparación con el grupo control ( $p > 0.05$ , **Figura 4.25**).



**Figura 4.25. Infiltración de macrófagos en las lesiones endometriósicas de los ratones tratados con el anticuerpo F8.G7 o con el anticuerpo control.** En el gráfico se representa el porcentaje de células inmunomarcadas con el marcador de macrófagos F4/80 ( $n = 5-6$  por grupo). Los valores representan la media  $\pm 1$  EEM. Las microfotografías son representativas de los ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Insertos: control negativo sin el anticuerpo primario. G: glándula endometriósica, E: estroma endometriósico. Las células inmunomarcadas se observan de color marrón.

## 5. DISCUSIÓN

Los dolores intensos que sufren las mujeres con endometriosis, sumado a la incapacidad de concebir son los síntomas más urgentes que motivan a los investigadores a encontrar alternativas para mitigar esta enfermedad. Además, si bien no se considera a la endometriosis como una patología maligna, en los últimos años se la ha asociado con el aumento de la incidencia de contraer determinados tipos de cáncer epitelial de ovario [18,19], lo cual pone de manifiesto la necesidad de abordar el estudio de su etiopatogenia.

La endometriosis tiene una prevalencia relativa elevada en la población femenina, y esto la convierte en la tercera patología ginecológica en importancia que afecta a las mujeres en edad reproductiva [9,10]. A pesar de ello, los mecanismos fisiopatológicos involucrados en su etiopatogenia multifactorial aún no se conocen completamente [2,37,38]. Sumado a esto, es relevante señalar la carencia de tratamientos que resulten absolutamente eficaces en contrarrestar la formación y el desarrollo de las lesiones endometriósicas. Además, los resultados de la terapéutica que se les propone actualmente a las pacientes que sufren de endometriosis son muy variables al momento de atenuar los síntomas clínicos característicos de esta enfermedad [178,179]. Este conjunto de factores nos motivó a indagar e intentar lograr una comprensión más profunda de los eventos fisiopatológicos que intervienen en la complejidad y en la consecuente sintomatología asociada a esta enfermedad.

Si bien hasta el momento no se conoce el rol potencial que Gal-1 podría estar jugando en la fisiopatología de la endometriosis, cabe señalar que estudios recientes reportaron que esta lectina juega un papel importante en la patogénesis de otras enfermedades relevantes en el área de la medicina reproductiva, como por ejemplo, en los abortos espontáneos recurrentes y en la pre-eclampsia [216,217,220,222]. Además, se ha demostrado desde hace aproximadamente una década que Gal-1 desempeña un rol inmunomodulador y pro-angiogénico significativo en diversas variantes de cáncer [199,206], las cuales comparten mecanismos fisiopatológicos similares a los conocidos hasta el momento para la endometriosis [18,19,133,238].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en principio decidimos estudiar el patrón de expresión tisular de Gal-1 en las lesiones endometriósicas y en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, como así también en el endometrio de pacientes controles. Luego comparamos los niveles de expresión proteica de esta lectina entre las lesiones endometriósicas y el endometrio eutópico de pacientes afectadas por diversos grados de severidad de esta patología; y posteriormente evaluamos el efecto diferencial que la inhibición endógena de la expresión de Gal-1 tiene sobre la tasa de proliferación *in vitro* de las células estromales endometriales de pacientes con endometriosis y de pacientes controles. Asimismo, abordamos el estudio de uno de los principales eventos involucrados en la fisiopatología de la endometriosis: la angiogénesis. Este proceso da lugar al desarrollo vascular de las lesiones endometriósicas y su consecuente crecimiento en el sitio ectópico, y es por lo tanto un evento imprescindible en la progresión de la enfermedad [155,157,239]. Por tal motivo, estudiamos *in vivo* el efecto de Gal-1 en la vascularización y en el crecimiento de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en un modelo murino, y evaluamos en este mismo modelo si el bloqueo específico de esta lectina a nivel peritoneal restringe el crecimiento de estas lesiones, de manera tal que nos permita vislumbrar si la inhibición de los mecanismos fisiopatológicos mediados por Gal-1 puede tener a futuro un eventual valor terapéutico que permita abordar las causas etiopatogénicas y por consiguiente la sintomatología característica de esta patología.

A partir de los primeros resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, podemos afirmar que Gal-1 se expresa de manera selectiva en las células estromales y con menor intensidad en las células endoteliales, tanto en las lesiones endometriósicas como en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis o controles. Este dato es muy importante y sorprendente dado que es poco común hallar una especificidad tan clara de expresión proteica en determinados tipos de células endometriales. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con las observaciones realizadas un trabajo previo en el cual se reportó la expresión de esta lectina en el tejido endometrial de mujeres a las que se les realizó una histerectomía a causa de patologías benignas como miomas e hipermenorrea. En dicho trabajo se observó que Gal-1 no sólo se expresa en el estroma endometrial si no que también se expresa débilmente en las células epiteliales [240], este resultado difiere del patrón de expresión tisular de Gal-1 observado en nuestro trabajo, en el cual no detectamos la expresión de esta lectina en las células epiteliales. Cabe destacar que nuestros datos

fueron confirmados tanto en cortes histológicos de las biopsias de pacientes como así también en cultivos primarios de dichas células.

Si bien no hallamos otros trabajos en los que se describa el patrón de expresión de Gal-1 en el tejido endometrial ordinario, existen estudios en los que se evaluó la expresión de Gal-1 en el tejido endometrial decidualizado. En estos trabajos, de manera similar a lo observado en nuestros resultados, se reportó una intensa expresión de Gal-1 en las células estromales decidualizadas pero no se detectó la expresión de esta lectina en el epitelio decidualizado [213,221,241].

En cuanto a los niveles de expresión proteica de Gal-1 semicuantificados por la técnica de Western blot, no hemos observado diferencias significativas de la expresión de esta lectina en el tejido endometrial entre pacientes con endometriosis y controles. Al respecto, recientemente se publicó un trabajo en el cual se reporta un incremento en la expresión proteica de Gal-1 en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis en comparación con el endometrio de pacientes que no presentan esta patología [242]. Con la intención de aclarar esta discrepancia, cabe mencionar que en el citado trabajo de Vergetaki y col. el número de muestras analizadas es sustancialmente bajo: 3 muestras por grupo experimental, lo cual cuestiona si los resultados obtenidos en dicho estudio son lo suficientemente representativos como para llegar a una conclusión contundente. En cambio, en nuestro trabajo realizamos la misma determinación experimental en base a un número de 27 muestras de tejido endometrial de pacientes con endometriosis y 27 muestras de tejido endometrial de pacientes controles, lo cual nos permitió realizar un análisis estadístico más contundente y llegar a resultados más representativos, a partir de los cuales como ya hemos mencionado, no observamos diferencias significativas de los niveles de expresión proteica de Gal-1 en el tejido endometrial entre pacientes con endometriosis y controles. Además, tampoco observamos diferencias en la concentración de Gal-1 en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis respecto del grupo control. Una explicación factible para estos resultados estaría centrada en nuestro grupo de pacientes control. Dado que la toma de biopsia de tejido endometrial debe estar justificada médicamente, el grupo control al que tenemos acceso está compuesto por mujeres que por supuesto no sufren de endometriosis, ni de alguna patología de origen tumoral, pero se someten a intervenciones laparoscópicas a causa de problemas de fertilidad asociados a patologías ginecológicas benignas como miomas uterinos, obstrucciones tubarias o infertilidad sin causa aparente.

Estas son patologías cuyas patogénesis están asociadas a factores de características inflamatorias [243-245], y como ya hemos mencionado en la introducción de esta tesis, Gal-1 desempeña un rol inmunomodulador muy importante en los procesos inflamatorios [204,235,246-248]. Por lo tanto, sugerimos que los niveles de expresión de esta lectina endógena en el endometrio eutópico, así como su concentración en el líquido peritoneal, se encontrarían alterados en las pacientes correspondientes al grupo control como consecuencia del efecto inflamatorio asociado a estas patologías, motivo por el cual es probable que este grupo no refleje fehacientemente los niveles de Gal-1 esperados en el caso de mujeres sanas. Sin embargo, resulta obvio aclarar que dado los impedimentos bioéticos asociados a la intervención de mujeres sanas nos resultó inviable contar con ese tipo de muestras.

A su vez, Vergetaki y col. también observaron, al igual que en nuestro trabajo, que la expresión proteica de Gal-1 en las lesiones ectópicas es significativamente mayor que en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis. Nuevamente se debe aclarar que en el citado trabajo el número de muestras evaluadas fue igual a 3 en cada grupo, mientras que en nuestro trabajo fue de 27 muestras de endometrio eutópico y de 41 muestras de lesiones endometriósicas, motivo por el cual consideramos que nuestro análisis estadístico y resultados son más representativos y contundentes.

Además, con la intención de esclarecer si el grado de severidad de la endometriosis tiene relación alguna con el incremento de la expresión de Gal-1 observado en las lesiones ectópicas respecto del tejido endometrial eutópico, en los casos en los que nos resultó posible basarnos en los criterios de clasificación de la severidad de esta patología establecidos por la ASRM [64], decidimos agrupar por un lado las biopsias endometriales y de lesiones de pacientes con un grado mínimo y leve de endometriosis (estadios I y II), y por el otro las biopsias de pacientes con un grado moderado y severo (estadios III y IV), para comparar entre ambos grupos la expresión proteica de Gal-1. Fue de esta manera como logramos comprobar que el incremento de los niveles de expresión de Gal-1 observado en las lesiones endometriósicas, comparado con los niveles de expresión en el tejido endometrial, se produce principalmente en las pacientes con un grado de severidad mínimo o leve de esta patología, dado que los niveles de expresión de esta lectina en las lesiones ectópicas y en el endometrio eutópico de las pacientes con un grado moderado o severo de endometriosis son similares. Asimismo, si bien no hallamos diferencias en los niveles de

expresión de Gal-1 en el endometrio eutópico entre pacientes con endometriosis mínima y leve respecto de las pacientes con endometriosis moderada y severa, es importante destacar que los niveles de Gal-1 son mayores en las lesiones provenientes de pacientes con endometriosis mínima o leve en comparación con las lesiones de pacientes con endometriosis moderada a severa.

Estos resultados novedosos aportan una nueva pieza al rompecabezas que representa la etiopatogenia multifactorial que caracteriza a esta patología, dado que las pacientes con endometriosis mínima o leve presentan lesiones que se encuentran en un estadio temprano de su desarrollo, y durante el cual son metabólicamente muy activas ya que diversos mecanismos fisiopatológicos como la invasión y la proliferación celular, la angiogénesis, y los mecanismos de evasión del sistema inmunológico, todos ellos involucrados en el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas en el sitio ectópico, alcanzan su pico máximo de actividad en esta etapa inicial [37,38,72]. En los estadios más avanzados, la enfermedad se vuelve crónica y los mecanismos que están involucrados en la proliferación celular se encuentran atenuados. Por lo tanto no debería resultarnos extraño que la expresión de Gal-1 se vea incrementada en las lesiones de las pacientes que se encuentran en los estadios tempranos de la enfermedad coincidentes con la etapa de mayor actividad inflamatoria de la misma, dado que esta lectina por sus ya mencionadas propiedades inmunológicas y angiogénicas podría encontrarse involucrada en todos estos eventos fisiopatológicos que son propios de las etapas iniciales correspondientes al establecimiento de la endometriosis.

En cuanto a la expresión de otros miembros de la familia de las galectinas en la endometriosis, se ha reportado que Gal-3 se expresa en mayor medida en el tejido endometriósico en comparación con el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis [249]. Por otro lado, también se ha reportado que Gal-8 se expresa abundantemente en el endometrio durante la fase secretora [250], y se ha propuesto a Gal-9 como un nuevo marcador endometrial asociado al periodo denominado ventana de implantación, durante el cual el endometrio presenta características bioquímicas y funcionales específicas que permiten la implantación del embrión, dado que la expresión selectiva de esta lectina en las células epiteliales endometriales se incrementa pronunciadamente durante la fase secretora media y tardía coincidiendo temporalmente con dicho periodo [251]. La contribución de

estos miembros de la familia de las galectinas a la progresión y gravedad de la endometriosis es un tópico que aún debe ser explorado.

Además de demostrar que Gal-1 es expresada intensamente en el estroma de las lesiones endometriósicas, también logramos determinar que esta lectina se encuentra presente en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis en concentraciones que rondan los 340 ng/ml, que resultan ser relativamente elevadas si se considera que la concentración de Gal-3 en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis reportada recientemente en el trabajo de Caserta y col. ronda los 65 ng/ml [252]. Pero a diferencia del citado trabajo, en el cual la concentración de Gal-3 en el líquido peritoneal se correlaciona positivamente con el grado de severidad de la endometriosis, en nuestro estudio el grado de severidad de esta patología no afecta los niveles de Gal-1 en el líquido peritoneal. Podemos suponer que este resultado es una consecuencia del hecho que en la cavidad peritoneal de las mujeres con endometriosis se genera un contexto inflamatorio severo que es característico de esta patología y del cual forman parte varias estirpes celulares, principalmente células inmunológicas, que también tienen la capacidad de sintetizar y secretar activamente Gal-1 al líquido peritoneal permitiendo alcanzar concentraciones sustancialmente elevadas de esta lectina [93,96,253].

Con la intención de indagar, al menos en parte, sobre el rol potencial que Gal-1 podría estar jugando la fisiopatología de la endometriosis, decidimos analizar el efecto de esta lectina endógena sobre la proliferación *in vitro* de las células estromales endometriales, por ser esta estirpe celular la que expresa mayoritariamente Gal-1 en el tejido endometrial. Para ello, utilizando un vector plasmídico que codifica un ARN<sup>sh</sup> de interferencia silenciamos parcialmente la expresión génica de esta lectina endógena en cultivos primarios puros de células estromales endometriales aisladas de biopsias de pacientes con endometriosis y controles. Notablemente, encontramos que la disminución parcial de la expresión de Gal-1 reduce la tasa de proliferación celular *in vitro* de las células estromales endometriales de pacientes con endometriosis, mientras que no tiene efecto alguno sobre la tasa de proliferación de las células de pacientes controles. Este resultado es muy singular si tenemos en cuenta que la distribución tisular y los niveles de expresión proteica de Gal-1 en el endometrio de las mujeres que padecen endometriosis son similares a los observados en el endometrio de las mujeres controles. Por lo tanto el hecho de que la inhibición endógena de Gal-1 reduzca la tasa de proliferación celular sólo en las células endometriales de las

pacientes con endometriosis podría implicar que esta diferencia manifestada por Gal-1 a nivel funcional, forma parte del cúmulo de evidencias experimentales que sustentan la hipótesis de que el endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis presenta características fisiológicas y bioquímicas distintivas que lo diferencian del endometrio de las mujeres normales, las cuales dotarían a las células endometriales eutópicas de mecanismos que les permiten sobrevivir, implantarse y proliferar en el sitio ectópico para constituir las lesiones endometriósicas [77,85,86].

Concordantemente, se ha reportado en varios trabajos que la inhibición parcial de la expresión de Gal-1 mediante técnicas de silenciamiento génico reduce la tasa de proliferación celular *in vitro* en modelos tumorales como por ejemplo las líneas celulares derivadas de cáncer epitelial de ovario: HeyA8 y SKOV3ip1 [254], las líneas celulares derivadas de cáncer de cuello uterino: HeLa y SiHa [255], y la línea celular derivada de glioma de rata: L9 [256].

Considerando que Gal-1 es una lectina que reconoce y se une a determinados glicanos que revisten a las glicoproteínas o glicolípidos presentes en la superficie celular [196,197,257], analizamos las características glicofenotípicas de las células estromales endometriales tanto de pacientes con endometriosis como de pacientes controles, para determinar si existe alguna diferencia en la dotación de glicanos dispuestos en su superficie celular que nos permita explicar el efecto diferencial de Gal-1 al promover la proliferación sólo en las células de pacientes con endometriosis. A diferencia de lo esperado, hallamos que tanto las células estromales endometriales de las pacientes con endometriosis como las de pacientes controles presentan un glicofenotipo “permissivo” similar para la unión de Gal-1, motivo por el cual el efecto observado de Gal-1 sobre la proliferación de las células estromales eutópicas de pacientes con endometriosis no parecería estar mediado por la unión de esta lectina a sus glicanos blanco dispuestos en la superficie celular.

Una probable explicación para estos resultados podría consistir en el hecho de que Gal-1 en lugar de estar promoviendo la proliferación de las células estromales eutópicas de las pacientes con endometriosis a través de su interacción a nivel extracelular con las glicoproteínas de la superficie, pudiera estar activando diferencialmente a nivel intracelular alguna de las vías proliferativas, dado que esta lectina también tiene la capacidad de reconocer y unirse mediante interacciones proteína a proteína con mediadores intracelulares involucrados en las vías de proliferación celular [258,259]. Sin embargo, los

mecanismos puntuales mediante los cuales Gal-1 estaría llevando a cabo esta función intracelular aún no han sido esclarecidos completamente.

A continuación, y teniendo siempre en mente el objetivo de investigar el papel fisiopatológico asociado a la expresión de Gal-1 en las lesiones endometriósicas, recurrimos al modelo murino de endometriosis experimental optimizado en nuestro laboratorio y para el cual utilizamos ratones deficientes de Gal-1 [170,194,227-229]. Dicho modelo experimental nos permitió estudiar *in vivo* el rol funcional de Gal-1 en la fisiopatología de la endometriosis, particularmente sobre el crecimiento y la vascularización de las lesiones endometriósicas, como así también evaluar el efecto del bloqueo específico de esta lectina a nivel peritoneal [229].

Cabe aclarar que los modelos murinos de endometriosis experimental se encuentran ampliamente aceptados y han sido utilizados extensivamente para estudiar e intentar comprender las causas o consecuencias asociadas a los variados y complejos mecanismos fisiopatológicos implicados en la etiopatogenia de esta enfermedad humana, como así también, se han utilizado con el propósito de evaluar diversas estrategias terapéuticas que luego puedan trasladarse al tratamiento médico de las mujeres afectadas por esta enfermedad [231,260-262].

Tal como puede observarse en los resultados obtenidos en los experimentos realizados con el modelo murino de endometriosis experimental, la presencia de Gal-1 tanto en las lesiones endometriósicas como en el entorno peritoneal es de vital importancia para el crecimiento de las mismas, dado que la falta de expresión de Gal-1 en el tejido endometrial ectópico que conforma las lesiones, su ausencia en el contexto peritoneal, o bien en ambos a la vez, dio lugar a una marcada reducción del tamaño de las mismas. Este resultado es de suma relevancia porque pone de manifiesto que esta lectina endógena ejerce un efecto fisiopatológico directo sobre las lesiones al promover su crecimiento.

Si bien no hallamos otros estudios que reporten el efecto de Gal-1 sobre el crecimiento de las lesiones endometriósicas, sí se han reportado trabajos concernientes a la fisiopatología de diversas formas de cáncer en los que se establece claramente que la expresión de esta lectina contribuye sustancialmente al crecimiento de los tumores inducidos experimentalmente en modelos murinos [202,225,263-265].

Aunque la deficiencia completa o parcial de la expresión de Gal-1 en nuestro modelo murino de endometriosis experimental demostró tener un efecto claro sobre el crecimiento

de las lesiones, no se observaron diferencias aparentes en la estructura histológica de dichas lesiones dado que en los grupos experimentales analizados las lesiones están similarmente conformadas por glándulas secretoras rodeadas por un estroma celular compacto o laxo. Además, el patrón de expresión tisular de Gal-1 en las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en el modelo murino, refleja consistentemente el patrón de expresión tisular observado en las lesiones de las pacientes con endometriosis, ya que en ambos casos la expresión de esta lectina se encuentra confinada principalmente a las células estromales y en menor medida a las células endoteliales, pero no se detectó expresión de Gal-1 en las células epiteliales. Este mismo patrón de expresión tisular de Gal-1 se observó en el tejido endometrial eutópico que tapiza la cara interna de los cuernos uterinos murinos, tal como ya se había reportado en trabajos anteriores al nuestro [266,267], y es equivalente al que observamos en este trabajo de tesis en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis o controles. Esta semejanza entre las lesiones humanas y murinas en cuanto a su estructura histológica y a la localización tisular de Gal-1 nos permite en cierta medida convalidar el modelo de endometriosis experimental que utilizamos en este trabajo.

A continuación fue importante estudiar alguno de los múltiples mecanismos fisiopatológicos mediante los cuales Gal-1 pudiese estar promoviendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas murinas. En base a literatura previa reportada principalmente en modelos de cáncer, decidimos evaluar si esta lectina se encuentra mediando efectos regulatorios pro-angiogénicos que promuevan el desarrollo de la red vascular requerida para sustentar el crecimiento activo de las lesiones.

De acuerdo a los resultados que se desprenden de esta tesis, la presencia de Gal-1 tanto en las lesiones endometriósicas y como en el entorno peritoneal resultó ser de vital importancia para sustentar el desarrollo vascular de las lesiones, dado que en los grupos experimentales en los cuales no se expresa Gal-1 en las lesiones y/o en la cavidad peritoneal, el desarrollo de la red vascular fue significativamente menor. Además es importante resaltar que el efecto pro-angiogénico mediado por Gal-1 mostró ser independiente del efecto mediado por otros factores pro-angiogénicos como el VEGF y la citoquina murina CXCL2-KC, esta última es un análogo funcional a la citoquina pro-angiogénica humana IL-8, ya que la concentración de ambos factores en el líquido peritoneal murino fue similar entre los cuatro grupos experimentales estudiados.

Estos resultados muestran concordancia con estudios recientes en los cuales se ha demostrado fehacientemente que Gal-1 promueve activamente el proceso de angiogénesis tumoral [207,208,225], y uno de los principales mecanismos inducidos por esta lectina en dicho proceso es la activación en forma independiente a la unión de su ligando canónico, de la vía de señalización intracelular mediada por el receptor tipo 2 de VEGF [210]. Por lo tanto, si consideramos que en nuestro trabajo no se observaron cambios significativos entre los grupos analizados en relación a la expresión tisular de VEGF en las lesiones o en su concentración en el líquido peritoneal, como así tampoco en la expresión vascular de su receptor VEGFR2, y sin embargo el tamaño y la vascularización de las lesiones endometriósicas se redujo acentuadamente en los grupos que no expresan Gal-1 ya sea en las lesiones y/o en el entorno peritoneal, podríamos sugerir que la ausencia de esta lectina en dichos grupos podría ser en gran medida la responsable de ocasionar una inhibición de las vías angiogénicas mediadas por el VEGFR2, y consecuentemente del menor desarrollo vascular observado en las lesiones correspondientes a estos grupos experimentales en comparación con el grupo de ratones que expresan niveles fisiológicos de Gal-1.

Además, se tiene conocimiento que los diferentes miembros de la familia de las galectinas también pueden modular la biología de las células endoteliales a través de diferentes mecanismos. Gal-3 induce la morfogénesis de las células endoteliales a través de la unión a los *N*-glicanos de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  [268]. Por otro lado, Gal-8 dispara la señalización intracelular en las células endoteliales tumorales a través de la unión a la molécula de adhesión celular de leucocitos activados (ALCAM; CD166) [269]. Esto deja en claro que, si bien no podemos descartar la existencia de vías compensatorias activadas por diferentes miembros de la familia de las galectinas en los mecanismos angiogénicos, en nuestro trabajo no parece que estas u otras potenciales vías compensatorias tengan un efecto angiogénico significativo que permita compensar la falta o reducción de Gal-1, dado que en los grupos experimentales que presentan una deficiencia parcial o total de esta lectina el desarrollo vascular de las lesiones no se compensa lo suficiente como para igualar al desarrollo vascular observado en los ratones que expresan niveles normales de Gal-1.

Como ya se mencionó en la introducción de este trabajo de tesis, los macrófagos corresponden a la población mayoritaria de células inmunológicas involucradas en la fisiopatología de la endometriosis [93], y además se ha reportado que estas células inmunológicas pueden promover la angiogénesis al infiltrar y secretar VEGF en las etapas

tempranas del desarrollo de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente en un modelo murino similar al nuestro [173].

Consecuentemente con los resultados obtenidos en relación a la expresión de VEGF en las lesiones y su concentración en el líquido peritoneal murino, tampoco hallamos diferencias entre los grupos estudiados en cuanto al número relativo de macrófagos que infiltraron las lesiones y que presumiblemente, aunque no exclusivamente, podrían ser una de las fuentes principales de secreción local de VEGF. Sin embargo, es importante dejar en claro que el marcador de superficie con el que contamos para identificar a estas células inmunológicas es expresado por la mayoría de las subpoblaciones macrofágicas y por lo tanto si bien el número porcentual de macrófagos que infiltraron las lesiones no varía significativamente entre los grupos estudiados, lamentablemente no contamos con información en relación al fenotipo funcional que presentan esos macrófagos infiltrantes.

También debemos considerar, como ya se explicó en la introducción de esta tesis, que Gal-1 posee propiedades inmunorreguladoras sumamente importantes entre las que podemos mencionar: la promoción de la apoptosis de las células T, la inducción de células dendríticas tolerogénicas, la expansión de las células T reguladoras, y la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo alternativo de tipo M2 [235,270,271]; motivo por el cual no podemos descartar el rol potencial de esta lectina endógena en el control de la respuesta inmune inflamatoria asociada a la endometriosis. Es así que podríamos sugerir que la reducción observada en el crecimiento de las lesiones endometriósicas en los grupos de ratones que no expresan Gal-1 quizás no sea sólo consecuencia de la desregulación del fenotipo angiogénico de las lesiones, sino que también en parte se deba a la desregulación de los mecanismos de tolerancia inmunológica mediados por Gal-1 [205,247]. Este es un tópico de gran relevancia fisiopatológica y clínica en el campo de la endometriosis y requiere de un estudio pormenorizado en un futuro.

Como ya se mencionó también en la introducción de esta tesis, las terapias actuales para tratar a las pacientes con endometriosis incluyen la citorreducción de las lesiones por cirugía laparoscópica y/o el tratamiento farmacológico [178,272]. Si bien ambas estrategias terapéuticas están dirigidas a mejorar los síntomas de la enfermedad, y en muchos casos lo consiguen, ninguna de ellas logra erradicar eficientemente las lesiones [58]. Esto trae como consecuencia que la tasa de recurrencia en las pacientes intervenidas quirúrgicamente sea elevada, alcanzando hasta un 40-50% luego de los 5 años de culminado el tratamiento [16].

Asimismo, los tratamientos farmacológicos prolongados que se les administran a las pacientes con endometriosis suelen ser poco efectivos y provocan efectos secundarios adversos, e incluso están contraindicados para las mujeres que desean lograr un embarazo [179,273].

Considerando esta problemática, sumado a los resultados concernientes al rol pro-angiogénico que Gal-1 ejerce sobre la vascularización y el consecuente crecimiento de las lesiones endometriósicas observados en nuestro modelo murino, ponen en relieve la importancia de estudiar si el bloqueo específico de los procesos fisiopatológicos mediados por esta lectina tiene potencial terapéutico. En ese sentido, decidimos evaluar en el modelo murino de endometriosis experimental, si la neutralización específica de Gal-1 a nivel peritoneal mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-Gal-1 (F8.G7) restringe el desarrollo de las lesiones endometriósicas y por lo tanto la progresión de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este trabajo son muy alentadores dado que el bloqueo de Gal-1 a nivel peritoneal con el anticuerpo neutralizante F8.G7 dio lugar a una gran disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas, y si bien no alteró la estructura histológica de las mismas, sí redujo sustancialmente la vascularización de dichas lesiones de manera independiente al efecto pro-angiogénico potencial que puedan estar ejerciendo VEGF o CXCL2-KC. Este resultado pone de manifiesto que la neutralización de los mecanismos fisiopatológicos mediados por Gal-1 podría resultar de gran implicancia terapéutica para contener e incluso reducir el avance de la endometriosis.

Tal como ya se ha demostrado para enfermedades neoplásicas, la interrupción selectiva de las redes de señalización vasculares representan un desafío importante en cuanto a su terapéutica. Lo mismo ocurre en el caso del tratamiento de la endometriosis. Es así que un número creciente de estudios se han centrado en la investigación de estrategias anti-angiogénicas para el tratamiento de esta patología. Entre estos, se incluyen el bloqueo selectivo de las vías de señalización de diversos factores de crecimiento, la administración de estatinas, de inhibidores de COX-2, de agonistas de la dopamina, y de agonistas de los receptores de proliferación activados por peroxisomas (PPARs) [170,228,239,274-282].

En relación a la investigación de las galectinas como blancos terapéuticos potenciales, se han desarrollado recientemente inhibidores que bloquean el dominio de reconocimiento de hidratos de carbono (DRC) de estas lectinas, que si bien pueden tener una amplia capacidad inhibidora, no tienen especificidad para los miembros individuales de la familia.

Por esta razón resulta difícil su aplicación terapéutica dado que de acuerdo a la naturaleza de la patología a tratar puede requerirse el bloqueo específico de alguno de los miembros de la familia de las galectinas y estos compuestos no tienen la capacidad de distinguirlos molecularmente [283,284]. Por otro lado, un grupo de investigación de Bélgica desarrolló un péptido sintético anti-angiogénico, denominado Anginex, que se une de manera muy eficiente a Gal-1 y bloquea su efecto biológico [207,209], por lo cual podría considerarse en un futuro para el tratamiento de patologías tumorales o de características inflamatorias crónicas como por ejemplo la endometriosis.

A modo de síntesis, en la parte final de este trabajo de tesis doctoral abordamos el estudio de la función de Gal-1 en la vascularización, uno de los eventos fisiopatológicos involucrados en la etiopatogenia de la endometriosis. También evaluamos si el bloqueo de esta lectina a nivel peritoneal posee la capacidad para restringir el desarrollo de las lesiones endometriósicas. Esperamos que estos datos puedan aportar evidencias científicas para establecer las bases que en un futuro permitan lograr un mejor conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad y el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces para mitigar el crecimiento de las lesiones ectópicas y por consiguiente la sintomatología asociada a la misma.

## 6. CONCLUSIONES

En base a los antecedentes presentados, a los novedosos resultados obtenidos y a las consideraciones realizadas en la discusión de este trabajo de tesis doctoral, se puede concluir que logramos demostrar que la expresión tisular de Gal-1 en las lesiones endometriósicas se limita particularmente a las células estromales y endoteliales dado que no se expresa en las células epiteliales. Además el nivel de expresión de esta lectina endógena es mayor en las lesiones endometriósicas que en el endometrio eutópico de las pacientes que presentan un grado de severidad mínimo o leve de endometriosis, indicando que Gal-1 podría jugar un papel primordial en los estadios tempranos concernientes al establecimiento y desarrollo de esta patología; y si bien no encontramos diferencias sustanciales en los niveles de expresión de Gal-1 en el endometrio ni en su concentración en el líquido peritoneal entre las pacientes con endometriosis y las pacientes controles, sí logramos establecer que Gal-1 tiene un efecto funcional diferencial que promueve la proliferación *in vitro* de las células estromales endometriales de las pacientes con endometriosis y no de las células endometriales de las pacientes controles, aunque el glicofenotipo que presentan en su superficie celular es igualmente permisivo para la unión de esta lectina en el endometrio control y en el de pacientes con endometriosis, se sugiere que este efecto diferencial observado podría estar mediado por las interacciones intracelulares que Gal-1 mantiene con algunos componentes de las vías asociadas a la proliferación celular, y que forma parte de las características fisiopatológicas que se le atribuyen al endometrio eutópico de las mujeres que padecen de endometriosis. Indudablemente, y más allá de las limitaciones que implica la experimentación con muestras de pacientes, resta mucho trabajo por realizar para ampliar los conocimientos obtenidos hasta el momento, pero es necesario insistir en el trabajo de investigación con muestras de pacientes para llegar a resultados que se aproximen con la mayor fidelidad posible a los eventos fisiopatológicos que se desencadenan en las mujeres afectadas por la endometriosis.

Además, como parte del mismo intento por desenmascarar el rol potencial que podría estar jugando Gal-1 en la fisiopatología de la endometriosis, recurrimos a un modelo murino de endometriosis experimental optimizado en nuestro laboratorio utilizando ratones deficientes en la expresión de Gal-1, mediante el cual pudimos demostrar que la presencia de Gal-1 en la lesión, en el entorno peritoneal, o en ambos simultáneamente, es de vital importancia para el desarrollo vascular y el consecuente crecimiento de las mismas. Y aunque no podemos descartar que los efectos inmunomoduladores mediados por Gal-1 podrían tener también un papel importante en el desarrollo de las lesiones, sí logramos demostrar en este modelo de endometriosis experimental que el efecto pro-angiogénico mediado por esta lectina es independiente de los efectos que potencialmente podrían estar ejerciendo otros factores pro-angiogénicos claves como VEGF, dejando en claro la importancia que tiene Gal-1 *per se* en la fisiopatología de la endometriosis. Finalmente, demostramos que el bloqueo específico a nivel peritoneal de Gal-1 restringe el crecimiento de las lesiones endometriósicas, motivo por el cual podemos sugerir a esta lectina como un blanco terapéutico potencial que en un futuro permita desarrollar tratamientos más eficaces a la hora de combatir la progresión de la endometriosis como así también la sintomatología asociada a esta enfermedad.

Sin perder de vista que queda mucho camino por recorrer para esclarecer completamente el rol de Gal-1 en la fisiopatología de la endometriosis y comprobar si su bloqueo selectivo tendrá implicancias terapéuticas relevantes, consideramos estos resultados como un aporte importante al entendimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 2389-2398.
2. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012; 98: 511-519.
3. Donnez J. Endometriosis: enigmatic in the pathogenesis and controversial in its therapy. *Fertil Steril* 2012; 98: 509-510.
4. Boyle DP, McCluggage WG. Peritoneal stromal endometriosis: a detailed morphological analysis of a large series of cases of a common and under-recognised form of endometriosis. *J Clin Pathol* 2009; 62: 530-533.
5. Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 335-338.
6. Vernon MW, Beard JS, Graves K *et al.* Classification of endometriotic implants by morphologic appearance and capacity to synthesize prostaglandin F. *Fertil Steril* 1986; 46: 801-806.
7. Hilaris GE, Payne CK, Osias J *et al.* Synchronous rectovaginal, urinary bladder, and pulmonary endometriosis. *JSLs* 2005; 9: 78-82.
8. Halis G, Arici A. Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034: 300-315.
9. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24: 235-258.
10. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364: 1789-1799.
11. Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 92-100.
12. Child TJ, Tan SL. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs* 2001; 61: 1735-1750.

13. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA *et al.* Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med* 2003; 21: 243-254.
14. Valle RF, Sciarra JJ. Endometriosis: treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 229-239.
15. Ebert AD, Fuhr N, David M *et al.* Histological confirmation of endometriosis in a 9-year-old girl suffering from unexplained cyclic pelvic pain since her eighth year of life. *Gynecol Obstet Invest* 2009; 67: 158-161.
16. Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 441-461.
17. Meuleman C, Tomassetti C, D'Hoore A *et al.* Surgical treatment of deeply infiltrating endometriosis with colorectal involvement. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 311-326.
18. Ness RB. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 280-294.
19. Varma R, Rollason T, Gupta JK *et al.* Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction* 2004; 127: 293-304.
20. McLeod BS, Retzliff MG. Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53: 389-396.
21. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C *et al.* The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod* 2012; 27: 1292-1299.
22. Signorile PG, Baldi A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 778-780.
23. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585-596.
24. Jensen JR, Coddington CC, III. Evolving spectrum: the pathogenesis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53: 379-388.
25. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* 1927; 3: 93-110.

26. Gazvani R, Templeton A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76: 117-126.
27. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-469.
28. Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1940; 40: 549-557.
29. Halme J, Hammond MG, Hulka JF *et al.* Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151-154.
30. Bartosik D, Jacobs SL, Kelly LJ. Endometrial tissue in peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1986; 46: 796-800.
31. Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN *et al.* Retrograde seeding of endometrial epithelial cells by uterine-tubal flushing. *Fertil Steril* 1991; 56: 414-420.
32. Bruner-Tran KL, Webster-Clair D, Osteen KG. Experimental endometriosis: the nude mouse as a xenographic host. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 328-339.
33. Bruner-Tran KL, Osteen KG, Duleba AJ. Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2489-2494.
34. Bruner-Tran KL, Carvalho-Macedo AC, Duleba AJ *et al.* Experimental endometriosis in immunocompromised mice after adoptive transfer of human leukocytes. *Fertil Steril* 2010; 93: 2519-2524.
35. Olive DL, Henderson DY. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 412-415.
36. Sanfilippo JS, Wakim NG, Schikler KN *et al.* Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 39-43.
37. Garai J, Molnar V, Varga T *et al.* Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue. *Front Biosci* 2006; 11: 595-619.
38. Tariverdian N, Theoharides TC, Siedentopf F *et al.* Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 193-210.
39. Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ *et al.* The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 447-457.

40. Kao AP, Wang KH, Chang CC *et al.* Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model. *Fertil Steril* 2011; 95: 1308-1315.
41. Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 106-115.
42. Nikoo S, Ebtekar M, Jeddi-Tehrani M *et al.* Menstrual blood-derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics. *Mol Hum Reprod* 2014; 20: 905-918.
43. Du H, Taylor HS. Contribution of Bone Marrow Derived Stem Cells to Endometrium and Endometriosis. *Stem Cells* 2007;
44. Figueira PG, Abrao MS, Krikun G *et al.* Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1221: 10-17.
45. Stratton P, Berkley KJ. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 327-346.
46. Milingos S, Protopapas A, Drakakis P *et al.* Laparoscopic management of patients with endometriosis and chronic pelvic pain. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 269-273.
47. Siedentopf F, Tariverdian N, Rucke M *et al.* Immune status, psychosocial distress and reduced quality of life in infertile patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 449-461.
48. Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P *et al.* Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril* 2011; 96: 366-373.
49. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S *et al.* Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 441-447.
50. Halme J, Surrey ES. Endometriosis and infertility: the mechanisms involved. *Prog Clin Biol Res* 1990; 323: 157-178.
51. Somigliana E, Benaglia L, Vigano' P *et al.* Surgical measures for endometriosis-related infertility: a plea for research. *Placenta* 2011; 32 Suppl 3: S238-S242.
52. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002; 123: 217-226.

53. Oral E, Arici A, Olive DL *et al.* Peritoneal fluid from women with moderate or severe endometriosis inhibits sperm motility: the role of seminal fluid components. *Fertil Steril* 1996; 66: 787-792.
54. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW *et al.* Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 643-649.
55. Wei Q, St Clair JB, Fu T *et al.* Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2009; 91: 1686-1691.
56. de Ziegler D, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 2010; 376: 730-738.
57. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C *et al.* ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20: 2698-2704.
58. Hickey M, Ballard K, Farquhar C. Endometriosis. *BMJ* 2014; 348: g1752-
59. Hoshiai H, Ishikawa M, Sawatari Y *et al.* Laparoscopic evaluation of the onset and progression of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 714-719.
60. Mounsey AL, Wilgus A, Slawson DC. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Physician* 2006; 74: 594-600.
61. Kyama CM, Mihalyi A, Gevaert O *et al.* Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 95: 1338-1343.
62. Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM *et al.* Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum Reprod* 2010; 25: 654-664.
63. Mabrouk M, Elmakky A, Caramelli E *et al.* Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2011;
64. ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67: 817-821.
65. Hornstein MD, Gleason RE, Orav J *et al.* The reproducibility of the revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 1015-1021.
66. Haas D, Shebl O, Shamiyeh A *et al.* The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013; 92: 3-7.

67. Wang W, Li R, Fang T *et al.* Endometriosis fertility index score maybe more accurate for predicting the outcomes of in vitro fertilisation than r-AFS classification in women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11: 112-
68. Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 2010; 94: 1609-1615.
69. Adamson GD. Endometriosis classification: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011; 23: 213-220.
70. D'Hooghe TM, Debrock S. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 84-88.
71. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009; 360: 268-279.
72. Jiang QY, Wu RJ. Growth mechanisms of endometriotic cells in implanted places: a review. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28: 562-567.
73. Meola J, Rosa e Silva JC, Dentillo DB *et al.* Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 93: 1750-1773.
74. Chehna-Patel N, Sachdeva G, Gajbhiye R *et al.* "Spot"-ting differences between the ectopic and eutopic endometrium of endometriosis patients. *Fertil Steril* 2010; 94: 1964-71, 1971.
75. Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 385-398.
76. Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 131-147.
77. Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 467-476.
78. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
79. Meresman G. [Relevance of apoptosis in the female reproductive system]. *Invest Clin* 2011; 52: 274-290.
80. Dmowski WP, Ding J, Shen J *et al.* Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16: 1802-1808.
81. Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 3496-3502.

82. Gebel HM, Braun DP, Tambur A *et al.* Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 1042-1047.
83. Meresman GF, Auge L, Baranao RI *et al.* Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: 1141-1147.
84. Meresman GF, Bilotas M, Abello V *et al.* Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84: 459-463.
85. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA *et al.* Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 760-766.
86. Johnson MC, Torres M, Alves A *et al.* Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 45-52.
87. Bilotas M, Baranao RI, Buquet R *et al.* Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod* 2007; 22: 644-653.
88. Harada T, Taniguchi F, Izawa M *et al.* Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci* 2007; 12: 3140-3151.
89. Agic A, Djalali S, Diedrich K *et al.* Apoptosis in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2009; 68: 217-223.
90. Nasu K, Yuge A, Tsuno A *et al.* Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis. *Histol Histopathol* 2009; 24: 1181-1192.
91. Nasu K, Nishida M, Kawano Y *et al.* Aberrant expression of apoptosis-related molecules in endometriosis: a possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2011; 18: 206-218.
92. Dmowski WP, Braun DP. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 245-263.
93. Tariverdian N, Siedentopf F, Rucke M *et al.* Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *J Reprod Immunol* 2009; 80: 80-90.
94. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM *et al.* Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 123-

95. Hill JA. Immunology and endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 262-264.
96. Dmowski WP, Gebel HM, Braun DP. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1994; 159: 7-14.
97. Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 696-701.
98. Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX *et al.* Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 707-710.
99. Montagna P, Capellino S, Villaggio B *et al.* Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation. *Fertil Steril* 2008; 90: 156-164.
100. Berbic M, Schulke L, Markham R *et al.* Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24: 325-332.
101. Braun DP, Gebel H, Rotman C *et al.* The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57: 1203-1210.
102. Raiter-Tenenbaum A, Baranao RI, Etchepareborda JJ *et al.* Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 1998; 261: 147-157.
103. Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 371-384.
104. Na YJ, Lee DH, Kim SC *et al.* Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of monocyte-specific chemokines by leukocytes. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283: 1333-1341.
105. Cao X, Yang D, Song M *et al.* The presence of endometrial cells in the peritoneal cavity enhances monocyte recruitment and induces inflammatory cytokines in mice: implications for endometriosis. *Fertil Steril* 2004; 82 Suppl 3: 999-1007.
106. Chuang PC, Wu MH, Shoji Y *et al.* Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *J Pathol* 2009; 219: 232-241.

107. Chuang PC, Lin YJ, Wu MH *et al.* Inhibition of CD36-dependent phagocytosis by prostaglandin E2 contributes to the development of endometriosis. *Am J Pathol* 2010; 176: 850-860.
108. Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. *Curr Med Chem* 2011; 18: 200-208.
109. Sun JC, Lanier LL. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol* 2009; 39: 2059-2064.
110. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 645-657.
111. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M *et al.* Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56: 45-51.
112. Wu MY, Yang JH, Chao KH *et al.* Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 1187-1191.
113. Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B *et al.* Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 295-300.
114. Osuga Y, Koga K, Hirota Y *et al.* Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65: 1-10.
115. Szylo K, Tchorzewski H, Banasik M *et al.* The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm* 2003; 12: 131-138.
116. Garcia-Velasco JA, Mulayim N, Kayisli UA *et al.* Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 855-859.
117. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Jr. *et al.* Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod* 2007; 22: 1373-1379.
118. Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C *et al.* Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 92-98.

119. Milewski L, Barcz E, Dziunycz P *et al.* Association of leptin with inflammatory cytokines and lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *J Reprod Immunol* 2008; 79: 111-117.
120. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 48-59.
121. Zhang X, Xu H, Lin J *et al.* Peritoneal fluid concentrations of interleukin-17 correlate with the severity of endometriosis and infertility of this disorder. *BJOG* 2005; 112: 1153-1155.
122. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K *et al.* Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology* 2008; 149: 1260-1267.
123. Hirata T, Osuga Y, Takamura M *et al.* Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 96: 113-117.
124. Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C *et al.* The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod* 2010; 25: 900-907.
125. Li MQ, Wang Y, Chang KK *et al.* CD4+Foxp3+ regulatory T cell differentiation mediated by endometrial stromal cell-derived TECK promotes the growth and invasion of endometriotic lesions. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1436-
126. Berbic M, Fraser IS. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *J Reprod Immunol* 2011; 88: 149-155.
127. Antsiferova YS, Sotnikova NY, Posiseeva LV *et al.* Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84: 1705-1711.
128. Fainaru O, Adini A, Benny O *et al.* Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J* 2008; 22: 522-529.
129. Schulke L, Berbic M, Manconi F *et al.* Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24: 1695-1703.
130. Stanic AK, Kim M, Styer AK *et al.* Dendritic cells attenuate the early establishment of endometriosis-like lesions in a murine model. *Reprod Sci* 2014; 21: 1228-1236.

131. Pencovich N, Luk J, Hantisteanu S *et al.* The development of endometriosis in a murine model is dependent on the presence of dendritic cells. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 515-521.
132. Klemmt PA, Carver JG, Koninckx P *et al.* Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Hum Reprod* 2007; 22: 3139-3147.
133. Machado DE, Berardo PT, Palmero CY *et al.* Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 4-
134. Sotnikova NY, Antsiferova YS, Posiseeva LV *et al.* Mechanisms regulating invasiveness and growth of endometriosis lesions in rat experimental model and in humans. *Fertil Steril* 2010; 93: 2701-2705.
135. Bulun SE, Gurates B, Fang Z *et al.* Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 21-33.
136. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K *et al.* Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 35-42.
137. Bulun SE, Yang S, Fang Z *et al.* Estrogen production and metabolism in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 75-85.
138. Huhtinen K, Desai R, Stahle M *et al.* Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 4228-4235.
139. Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T *et al.* Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 1997; 57: 514-519.
140. Bulun SE, Fang Z, Imir G *et al.* Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2004; 22: 45-50.
141. Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 49-56.

142. Huhtinen K, Stahle M, Perheentupa A *et al.* Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 358: 146-154.
143. Fujishita A, Nakane PK, Koji T *et al.* Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil Steril* 1997; 67: 856-864.
144. Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev* 2013; 34: 130-162.
145. Banu SK, Lee J, Speights VO, Jr. *et al.* Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinology* 2008; 149: 1180-1189.
146. Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F *et al.* Analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in different sites of endometriosis and correlation with clinico-pathological parameters. *Hum Reprod* 2004; 19: 393-397.
147. Attar E, Tokunaga H, Imir G *et al.* Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 623-631.
148. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM *et al.* Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 600-606.
149. Medina MG, Lebovic DI. Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009; 88: 968-975.
150. Mechsner S, Kaiser A, Kopf A *et al.* A pilot study to evaluate the clinical relevance of endometriosis-associated nerve fibers in peritoneal endometriotic lesions. *Fertil Steril* 2009; 92: 1856-1861.
151. Tokushige N, Markham R, Russell P *et al.* Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* 2006; 21: 3001-3007.
152. Arnold J, Barcena de Arellano ML, Ruster C *et al.* Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis. *Brain Behav Immun* 2012; 26: 132-141.
153. Barcena de Arellano ML, Arnold J, Vercellino GF *et al.* Influence of nerve growth factor in endometriosis-associated symptoms. *Reprod Sci* 2011; 18: 1202-1210.

154. Barcena de Arellano ML, Arnold J, Vercellino F *et al.* Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions. *Fertil Steril* 2011; 95: 1123-1126.
155. Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E *et al.* Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005; 8: 147-156.
156. Taylor RN, Yu J, Torres PB *et al.* Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci* 2009; 16: 140-146.
157. Laschke MW, Giebels C, Menger MD. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 628-636.
158. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
159. Welti J, Loges S, Dimmeler S *et al.* Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* 2013; 123: 3190-3200.
160. Hardee ME, Zagzag D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* 2012; 181: 1126-1141.
161. Menegazzo L, Albiero M, Avogaro A *et al.* Endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Biofactors* 2012; 38: 194-202.
162. Laschke MW, Giebels C, Nickels RM *et al.* Endothelial progenitor cells contribute to the vascularization of endometriotic lesions. *Am J Pathol* 2011; 178: 442-450.
163. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 89-100.
164. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 45-55.
165. Donnez J, Smoes P, Gillerot S *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1686-1690.
166. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996; 11: 220-223.
167. Takehara M, Ueda M, Yamashita Y *et al.* Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis. *Hum Pathol* 2004; 35: 1369-1375.

168. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S *et al.* The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction* 2006; 132: 501-509.
169. Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA *et al.* Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1089-1095.
170. Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA *et al.* Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition on Endometrial Implant Development in a Murine Model of Endometriosis. *Reprod Sci* 2011; 18: 614-622.
171. Dormer A, Beck G. Evolutionary analysis of human vascular endothelial growth factor, angiopoietin, and tyrosine endothelial kinase involved in angiogenesis and immunity. *In Silico Biol* 2005; 5: 323-339.
172. Drenkhahn M, Gescher DM, Wolber EM *et al.* Expression of angiopoietin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril* 2004; 81 Suppl 1: 869-875.
173. Lin YJ, Lai MD, Lei HY *et al.* Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* 2006; 147: 1278-1286.
174. Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA *et al.* Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 269-275.
175. Arici A, Tazuke SI, Attar E *et al.* Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 40-45.
176. Iwabe T, Harada T, Tsudo T *et al.* Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 924-930.
177. Crosignani P, Olive D, Bergqvist A *et al.* Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 179-189.
178. Brown J, Farquhar C. An overview of treatments for endometriosis. *JAMA* 2015; 313: 296-297.

179. Brown J, Farquhar C. Endometriosis: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 3: CD009590-
180. Vercellini P, Vigano P, Somigliana E *et al.* Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10: 261-275.
181. Abbott J, Hawe J, Hunter D *et al.* Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2004; 82: 878-884.
182. Somigliana E, Berlanda N, Benaglia L *et al.* Surgical excision of endometriomas and ovarian reserve: a systematic review on serum antimullerian hormone level modifications. *Fertil Steril* 2012; 98: 1531-1538.
183. Vercellini P, Somigliana E, Vigano P *et al.* Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. *Drugs* 2009; 69: 649-675.
184. Vercellini P, Fedele L, Pietropaolo G *et al.* Progestogens for endometriosis: forward to the past. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 387-396.
185. Vercellini P, Cortesi I, Crosignani PG. Progestins for symptomatic endometriosis: a critical analysis of the evidence. *Fertil Steril* 1997; 68: 393-401.
186. Jana NR. NSAIDs and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2008;
187. Ferrero S, Gillott DJ, Venturini PL *et al.* Use of aromatase inhibitors to treat endometriosis-related pain symptoms: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 89-112.
188. Attar E, Bulun SE. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril* 2006; 85: 1307-1318.
189. Olivares C, Bilotas M, Buquet R *et al.* Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008; 23: 2701-2708.
190. Epstein RJ. VEGF signaling inhibitors: more pro-apoptotic than anti-angiogenic. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 443-452.
191. Yao Z, Shen X, Capodanno I *et al.* Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds. *J Invest Surg* 2005; 18: 177-183.

192. Flower A, Liu JP, Lewith G *et al.* Chinese herbal medicine for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 5: CD006568-
193. Flower A, Liu JP, Chen S *et al.* Chinese herbal medicine for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD006568-
194. Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA *et al.* Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2013; 28: 178-188.
195. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 209-231.
196. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: e17-
197. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS *et al.* Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17: 513-520.
198. Salatino M, Rabinovich GA. Fine-tuning antitumor responses through the control of galectin-glycan interactions: an overview. *Methods Mol Biol* 2011; 677: 355-374.
199. Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* 2005; 92: 1188-1192.
200. Rabinovich GA, Ilarregui JM. Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunol Rev* 2009; 230: 144-159.
201. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; 8: 825-834.
202. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004; 5: 241-251.
203. Garin MI, Chu CC, Golshayan D *et al.* Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2007; 109: 2058-2065.
204. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 338-352.

205. Iarregui JM, Croci DO, Bianco GA *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009; 10: 981-991.
206. Demydenko D, Berest I. Expression of galectin-1 in malignant tumors. *Exp Oncol* 2009; 31: 74-79.
207. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ *et al.* Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15975-15980.
208. Thijssen VL, Barkan B, Shoji H *et al.* Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res* 2010; 70: 6216-6224.
209. Brandwijk RJ, Dings RP, van der LE *et al.* Anti-angiogenesis and anti-tumor activity of recombinant anginex. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 1073-1078.
210. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T *et al.* Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. *Cell* 2014; 156: 744-758.
211. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29: 10-14.
212. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 328-335.
213. Vicovac L, Jankovic M, Cuperlovic M. Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Reprod* 1998; 13: 730-735.
214. Jeschke U, Hutter S, Heublein S *et al.* Expression and function of galectins in the endometrium and at the human feto-maternal interface. *Placenta* 2013; 34: 863-872.
215. Ramhorst RE, Giribaldi L, Fraccaroli L *et al.* Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. *Glycobiology* 2012; 22: 1374-1386.
216. Barrientos G, Freitag N, Tirado-Gonzalez I *et al.* Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update* 2014; 20: 175-193.
217. Blois SM, Iarregui JM, Tometten M *et al.* A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 2007; 13: 1450-1457.

218. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12: 1065-1074.
219. Karimi K, Arck PC. Natural Killer cells: keepers of pregnancy in the turnstile of the environment. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 339-347.
220. Tirado-Gonzalez I, Freitag N, Barrientos G *et al.* Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2013; 19: 43-53.
221. Than NG, Erez O, Wildman DE *et al.* Severe preeclampsia is characterized by increased placental expression of galectin-1. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 429-442.
222. Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Barrientos G *et al.* Interfering with Gal-1-mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 11451-11456.
223. Jeschke U, Toth B, Scholz C *et al.* Glycoprotein and carbohydrate binding protein expression in the placenta in early pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2010; 85: 99-105.
224. Mylonas I, Mayr D, Walzel H *et al.* Mucin 1, Thomsen-Friedenreich expression and galectin-1 binding in endometrioid adenocarcinoma: an immunohistochemical analysis. *Anticancer Res* 2007; 27: 1975-1980.
225. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N *et al.* Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2012; 209: 1985-2000.
226. Castro J, Torres M, Sovino H *et al.* P450Arom induction in isolated control endometrial cells by peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 94: 2521-2527.
227. Bilotas M, Meresman G, Stella I *et al.* Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 93: 2513-2518.
228. Olivares C, Ricci A, Bilotas M *et al.* The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 96: 428-433.
229. Baston JI, Baranao RI, Ricci AG *et al.* Targeting galectin-1-induced angiogenesis mitigates the severity of endometriosis. *J Pathol* 2014;

230. Sequeira G, Vanzulli SI, Rojas P *et al*. The effectiveness of nano chemotherapeutic particles combined with mifepristone depends on the PR isoform ratio in preclinical models of breast cancer. *Oncotarget* 2014; 5: 3246-3260.
231. Edwards AK, Nakamura DS, Virani S *et al*. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2013; 97: 85-94.
232. Schatz F, Soderland C, Hendricks-Munoz KD *et al*. Human endometrial endothelial cells: isolation, characterization, and inflammatory-mediated expression of tissue factor and type 1 plasminogen activator inhibitor. *Biol Reprod* 2000; 62: 691-697.
233. Belo AV, Leles F, Barcelos LS *et al*. Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation* 2005; 12: 597-606.
234. Barcz E, Rozewska ES, Kaminski P *et al*. Angiogenic activity and IL-8 concentrations in peritoneal fluid and sera in endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 79: 229-235.
235. Rabinovich GA, Croci DO. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 2012; 36: 322-335.
236. Fan YY, Chapkin RS. Mouse peritoneal macrophage prostaglandin E1 synthesis is altered by dietary gamma-linolenic acid. *J Nutr* 1992; 122: 1600-1606.
237. Ouyang J, Juszczynski P, Rodig SJ *et al*. Viral induction and targeted inhibition of galectin-1 in EBV+ posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood* 2011; 117: 4315-4322.
238. Meng Q, Sun W, Jiang J *et al*. Identification of common mechanisms between endometriosis and ovarian cancer. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 917-923.
239. Becker CM, D'Amato RJ. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. *Microvasc Res* 2007; 74: 121-130.
240. von Wolff M, Wang X, Gabius HJ *et al*. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 189-194.
241. Maquoi E, van den Brule FA, Castronovo V *et al*. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta* 1997; 18: 433-439.

242. Vergetaki A, Jeschke U, Vrekoussis T *et al.* Galectin-1 overexpression in endometriosis and its regulation by neuropeptides (CRH, UCN) indicating its important role in reproduction and inflammation. *PLoS One* 2014; 9: e114229-
243. Plewka A, Madej P, Plewka D *et al.* Immunohistochemical localization of selected pro-inflammatory factors in uterine myomas and myometrium in women of various ages. *Folia Histochem Cytobiol* 2013; 51: 73-83.
244. Ciavattini A, Di GJ, Stortoni P *et al.* Uterine fibroids: pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. *Obstet Gynecol Int* 2013; 2013: 173184-
245. Weissenbacher T, Kuhn C, Mayr D *et al.* Expression of mucin-1, galectin-1 and galectin-3 in human leiomyosarcoma in comparison to leiomyoma and myometrium. *Anticancer Res* 2011; 31: 451-457.
246. Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Ilarregui JM *et al.* A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol* 2007; 178: 436-445.
247. Cooper D, Ilarregui JM, Pesoa SA *et al.* Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. *Methods Enzymol* 2010; 480: 199-244.
248. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 158-182.
249. Noel JC, Chapron C, Borghese B *et al.* Galectin-3 is overexpressed in various forms of endometriosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011; 19: 253-257.
250. Nikzad H, Haddad KH, Kabir-Salmani M *et al.* Expression of galectin-8 on human endometrium: Molecular and cellular aspects. *Iran J Reprod Med* 2013; 11: 65-70.
251. Popovici RM, Krause MS, Germeyer A *et al.* Galectin-9: a new endometrial epithelial marker for the mid- and late-secretory and decidual phases in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6170-6176.
252. Caserta D, Di BL, Bordi G *et al.* Levels of Galectin-3 and Stimulation Expressed Gene 2 in the peritoneal fluid of women with endometriosis: a pilot study. *Gynecol Endocrinol* 2014; 1-4.

253. Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S *et al.* New insights into the pathophysiology of endometriosis: from chronic inflammation to danger signal. *Gynecol Endocrinol* 2011; 27: 73-79.
254. Kim HJ, Jeon HK, Cho YJ *et al.* High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer* 2012; 48: 1914-1921.
255. Kim HJ, Do IG, Jeon HK *et al.* Galectin 1 expression is associated with tumor invasion and metastasis in stage IB to IIA cervical cancer. *Hum Pathol* 2013; 44: 62-68.
256. Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y *et al.* Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res* 2000; 59: 722-730.
257. Stowell SR, Dias-Baruffi M, Penttila L *et al.* Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. *Glycobiology* 2004; 14: 157-167.
258. Scott K, Weinberg C. Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation. *Glycoconj J* 2004; 19: 467-477.
259. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 29-41.
260. Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R *et al.* A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol* 2006; 168: 2074-2084.
261. Tirado-Gonzalez I, Barrientos G, Tariverdian N *et al.* Endometriosis research: animal models for the study of a complex disease. *J Reprod Immunol* 2010;
262. Greaves E, Cousins FL, Murray A *et al.* A novel mouse model of endometriosis mimics human phenotype and reveals insights into the inflammatory contribution of shed endometrium. *Am J Pathol* 2014; 184: 1930-1939.
263. Szebeni GJ, Kriston-Pal E, Blazso P *et al.* Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion. *PLoS One* 2012; 7: e41372-
264. Chung LY, Tang SJ, Sun GH *et al.* Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 4037-4047.

265. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP *et al.* Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res* 2013; 73: 1107-1117.
266. Phillips B, Knisley K, Weitlauf KD *et al.* Differential expression of two beta-galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol Reprod* 1996; 55: 548-558.
267. Choe YS, Shim C, Choi D *et al.* Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 261-266.
268. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R *et al.* Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 899-909.
269. Delgado VM, Nugnes LG, Colombo LL *et al.* Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8. *FASEB J* 2011; 25: 242-254.
270. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N *et al.* Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23: 313-320.
271. Rubinstein N, Iarregui JM, Toscano MA *et al.* The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 2004; 64: 1-12.
272. Rocha AL, Reis FM, Petraglia F. New trends for the medical treatment of endometriosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21: 905-919.
273. Vercellini P, Crosignani P, Somigliana E *et al.* 'Waiting for Godot': a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2011; 26: 3-13.
274. Olivares CN, Bilotas MA, Ricci AG *et al.* Anastrozole and celecoxib for endometriosis treatment, good to keep them apart? *Reproduction* 2013; 145: 119-126.
275. Becker CM, Sampson DA, Rupnick MA *et al.* Endostatin inhibits the growth of endometriotic lesions but does not affect fertility. *Fertil Steril* 2005; 84 Suppl 2: 1144-1155.
276. Becker CM, Sampson DA, Short SM *et al.* Short synthetic endostatin peptides inhibit endothelial migration in vitro and endometriosis in a mouse model. *Fertil Steril* 2006; 85: 71-77.

277. Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T *et al.* 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1{alpha} and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 534-544.
278. Xu H, Becker CM, Lui WT *et al.* Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo. *Fertil Steril* 2011; 96: 1021-1028.
279. Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B *et al.* Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2006; 21: 262-268.
280. Laschke MW, Menger MD. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2012; 18: 682-702.
281. Novella-Maestre, E., Simon, C., and Pellicer, A Modulation of angiogenesis by the dopamine agonist Cabergoline in experimentally-induced peritoneal endometriotic lesions Novella-Maestre, E., Simon, C., and Pellicer, A Novella-Maestre, E., Simon, C., and Pellicer, A
282. Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I *et al.* Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24: 1025-1035.
283. Ingrassia L, Camby I, Lefranc F *et al.* Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. *Curr Med Chem* 2006; 13: 3513-3527.
284. Rabinovich GA, Cumashi A, Bianco GA *et al.* Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. *Glycobiology* 2006; 16: 210-220.

# PUBLICACIONES

Los resultados de este trabajo de tesis doctoral forman parte de las siguientes publicaciones científicas:

## Revistas internacionales con referato:

- Targeting galectin-1-induced angiogenesis mitigates the severity of endometriosis. **Bastón JI**, Barañao RI, Ricci AG, Bilotas M, Olivares CN, Singla JJ, Gonzalez AM, Stupirski JC, Croci D, Rabinovich GA y Meresman G. *The Journal of Pathology*, 234 (3): 329 – 337, Nov. 2014. Epub: 8 Ago. 2014.

## Revistas nacionales con referato:

- Caracterización del endometrio y del ambiente peritoneal de mujeres que padecen endometriosis. Estudios *in vivo* e *in vitro* de nuevas alternativas terapéuticas para esta enfermedad. Meresman G, Bilotas M, Olivares C, Ricci A, **Bastón JI**, Barañao RI. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (ABCL)* 45(4):635-638, 2011. ISSN 1851-6114.

## Disertaciones en Congresos, Jornadas Científicas y Seminarios Institucionales:

- Galectina-1 y ácido hialurónico asociados a la promoción de la angiogénesis en la endometriosis experimental. Ciclo de Seminarios Institucionales del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), el día 29 de Octubre de 2014 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Galectina-1 desempeña un rol pro-angiogénico esencial promoviendo la vascularización y crecimiento de las lesiones endometriósicas en un modelo experimental murino. Simposio “Patología reproductiva: del laboratorio a la clínica”, LVIII Reunión Anual de la

Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), 20 de Noviembre de 2013, Ciudad de Mar de Plata, Argentina.

- Participación de Galectina-1 en el desarrollo de la endometriosis. Ciclo de Seminarios organizados conjuntamente por la Universidad Nacional de San Luis y el Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas San Luis – CONICET, el día 23 de Septiembre de 2011 en la Ciudad de San Luis.
- Participación de Galectina-1 en el desarrollo de la endometriosis. Simposio Internacional de la Sociedad Argentina de Endometriosis, el día 24 de Junio de 2011 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Endometriosis: participación de Galectina-1 en su desarrollo. Ciclo de Seminarios Institucionales del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), el día 20 de Abril de 2011 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

**Presentaciones de pósters o comunicaciones orales en Congresos, Jornadas Científicas y Simposios nacionales e internacionales:**

- Targeting the galectin-1-mediated angiogenesis at peritoneal level is crucial to constrain the progress of endometriosis. **Bastón JI**, Barañao RI, Bilotas M, Croci D, Rabinovich GA y Meresman G. 12<sup>th</sup> World Congress on Endometriosis, 30 de Abril al 3 de Mayo de 2014, San Pablo, Brasil. Modalidad: póster.
- Galectin-1 plays a pivotal role promoting the vascular network development in endometriotic lesions. **Bastón JI**, Barañao RI, Ricci A, Olivares C, Rabinovich GA y Meresman G. 12<sup>th</sup> World Congress of Endometriosis, 30 de Abril al 3 de Mayo de 2014, San Pablo, Brasil. Modalidad: póster.
- Galectin-1 promotes vascular development and growth of endometriotic-like lesions in a mouse model of endometriosis. **Bastón JI**, Barañao RI, Ricci A, Bilotas M, Olivares C, Croci D, Rabinovich GA y Meresman G. International Postgraduate Workshop 2012 of

Vascular Dysfunction Mechanisms, 2 y 3 de Octubre de 2012, en la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Modalidad: póster.

- Galectina-1 promueve la vascularización de las lesiones endometriósicas en un modelo experimental murino. **Bastón JI**, Barañao RI, Ricci A, Bilotas M, Olivares C, Croci D, Rabinovich GA y Meresman G. XXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, 5 – 8 de Septiembre de 2012, Viña del Mar, Chile. Modalidad: comunicación oral.
- Galectin-1 expression in human and mice endometriotic and endometrial tissue is restricted to stromal and vascular cells". **Bastón JI**, Ricci A, Bilotas M, Olivares C, Gonzalez AM, Singla JJ, Rabinovich GA, Barañao RI y Meresman G. 11<sup>th</sup> World Congress on Endometriosis, 4 - 7 de Septiembre de 2011, Montpellier, Francia. Modalidad: póster.
- Expresión localizada de Galectina-1 en el estroma de lesiones y endometrio de pacientes con endometriosis. **Bastón JI**, Ricci A, Bilotas M, Olivares C, Gonzalez AM, Singla JJ, Rabinovich GA, Barañao RI y Meresman G. 2<sup>da</sup> Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina, 17 - 19 de Agosto de 2011, San Juan, Argentina. Modalidad: póster. Abstract: Biocell 35 (3): A296-Abstract N°368, 2011.
- Estudio del rol de galectina-1 en la fisiopatología de la endometriosis. **Bastón JI**, Ricci A, Bilotas M, Olivares C, Rabinovich GA, Barañao RI y Meresman G. XII Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, 1 a 3 de Diciembre de 2010, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Modalidad: comunicación oral. Abstract: Biocell 35 (1): A69-Abstract N°9, 2011.
- Galectina-1 contribuye al crecimiento de lesiones endometriósicas en un modelo murino. **Bastón JI**, Ricci A, Bilotas M, Olivares C, Rabinovich GA, Barañao RI y Meresman G. XXI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, 1 - 4 de Septiembre de 2010, La Serena, Chile. Modalidad: póster. El trabajo fue distinguido con una Mención de Honor.