

PROGRESOS de OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

www.elsevier.es/pog



ORIGINAL

Inducción de endometriosis en rata Wistar, mediante autotransplante de fragmento uterino, sobre cicatriz previamente producida en el cuerno uterino izquierdo

Pedro González Ramos ^{a,*}, Cristina Pastor Oliver ^b, Cristina González Pastor ^b, Francisco Javier Manero Ruiz ^c, Ángela Pecondón Español ^c, Pedro Royo Manero ^d, Juan Luis Alcázar Zambrano ^e y Ernesto Fabre González ^a

^a Servicio de Ginecología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

^b Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, España

^c Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

^d Servicio de Ginecología y Obstetricia, Clínica San Miguel, Pamplona, Navarra, España

^e Departamento de Ginecología y Obstetricia, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Navarra, España

Recibido el 16 de julio de 2011; aceptado el 16 de agosto de 2011

Accesible en línea el 2 de diciembre de 2011

PALABRAS CLAVE

Endometriosis;
Microcirugía
ginecológica;
Rata Wistar

Resumen

Objetivo: Estudiar la posibilidad de inducir endometriosis interna/externa en rata wistar, a través de un nuevo modelo microquirúrgico, que denominamos PGR 1.

Sujetos y métodos: Se han utilizado 11 ratas Wistar, a las que se ha realizado un autotransplante de fragmento uterino, sobre la cicatriz resultante de la cirugía necesaria para su obtención. Despues de 8 semanas se les practicó una nueva intervención, para la inspección de la cavidad abdominal y la toma de muestras relevantes para su estudio anatomo-patológico.

Resultados: Macroscópicos: adherencias que afectaban fundamentalmente a la zona del implante; vesículas amarillentas. Microscópicos: vesículas/quistes; fenómenos inflamatorios; neovascularización; endometriosis interna en un animal.

Conclusiones: Este nuevo modelo de implante nos puede ayudar a comprender mejor los mecanismos involucrados en la aparición de endometriosis, tanto interna como externa.

© 2011 SEGO. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Endometriosis;
Gynecological
microsurgery;
Wistar rat

Induction of endometriosis in Wistar rats through autologous transplantation of a uterine fragment over a previous scar in the left uterine horn

Abstract

Objective: To study the possibility of inducing internal or external endometriosis in Wistar rats through a new microsurgical model known as PGR 1.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pegonzalezra15@yahoo.es (P. González Ramos).

Subjects and methods: Eleven Wistar rats underwent autologous transplantation of a uterine fragment over a deliberately created scar. After 8 weeks, a further intervention was carried out to inspect the abdominal cavity and take samples for pathological analysis.

Results: Macroscopic results consisted of adhesions mainly affecting the implant and yellow vesicles. Microscopic findings consisted of vesicles/cysts, inflammatory phenomena, neovascularization, and internal endometriosis in one animal

Conclusions: This new implant model could enhance our understanding of the mechanisms involved in the development of endometriosis, both internal and external.

© 2011 SEGO. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La endometriosis es una enfermedad ginecológica que afecta fundamentalmente a las mujeres en edad reproductiva. Se define por la presencia de tejido endometrial, funcional, fuera de la cavidad uterina y puede provocar dolor pélvico e infertilidad en la mujer que la padece.

Todavía no se conocen con exactitud los mecanismos subyacentes al establecimiento y el desarrollo de esta patología. Los modelos animales¹ permiten estudiar la secuencia temporal de los eventos involucrados en la génesis y en la progresión de la enfermedad. Además, esta enfermedad se produce de forma espontánea sólo en los seres humanos y los primates no humanos, por lo que hay problemas prácticos relacionados con los modelos utilizados para su estudio.

Las líneas actuales de investigación, basadas principalmente en la teoría de la menstruación retrógrada, descrita por Sampson en 1927, han ido estableciendo los múltiples factores bioquímicos, inmunológicos y moleculares implicados en la fisiopatología de la endometriosis². Si se tiene en cuenta que el implante endometriósico requiere cinco pasos fundamentales —adhesión, invasión, reclutamiento, angiogénesis y proliferación— para desarrollarse, serán los dos primeros procesos, los que deberíamos estudiar, con la perspectiva de encontrar algún factor que facilite su diagnóstico o tratamiento²⁻⁴.

Dentro de esta línea de investigación hemos querido estudiar el comportamiento de un autotransplante de fragmento uterino en la rata Wistar, sobre una cicatriz creada para conseguirlo.

Material y métodos

Para la realización del presente trabajo, empleamos once ratas Wistar hembra con un peso aproximado de 200 g y una edad de 10 semanas. Los animales fueron proporcionados y estabulados por el servicio de biomedicina y biomateriales, de los Servicios de Apoyo a la Investigación, de la Universidad de Zaragoza.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo siguiendo un protocolo de actuación autorizado por la comisión de ética para la experimentación animal de la Universidad de Zaragoza (número de registro PD 12/10).

Los animales fueron identificados en el momento de la estabulación con las siglas CPC y el número desde 01 al 11, correlativamente. Todos los animales fueron pesados en una báscula de precisión para animal vivo marca Mettler Toledo.

Material quirúrgico

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo condiciones de esterilidad.

Para la realización de los procedimientos microquirúrgicos utilizamos un microscopio operatorio binocular de la marca Leica.

Instrumental quirúrgico convencional para la realización de la laparotomía:

- Bisturí estéril desechable del n.º 11.
- Porta agujas macroquirúrgico.
- Pinzas de disección de Adson.
- Tijeras de corte de Mayo.
- Tijeras de disección de Metzenbaum.

Instrumental microquirúrgico empleado para la inducción experimental de endometriosis:

- Porta agujas microquirúrgico.
- Pinzas de disección microquirúrgicas.
- Tijeras de Westcott.
- Bisturí eléctrico bipolar marca Martin.

Procedimientos quirúrgicos

Procedimiento anestésico

Todos los animales fueron sometidos a anestesia general inhalatoria, empleando un aparato de anestesia para pequeños animales marca Abbott, con vaporizador de anestesia marca Draguer, usando como gas anestésico el sevoflurano vehiculado con oxígeno. Para la inducción anestésica de estos animales, se utilizó una cámara de inducción de anestesia de animal de laboratorio de metacrilato, conectada al aparato de anestesia con un 5% de concentración del gas anestésico sevoflurano. El mantenimiento de la anestesia se realizó mediante mascarilla rostral para rata, conectada al aparato de anestesia, con la misma concentración de gas anestésico que la utilizada en la cámara de inducción.

Primera laparotomía

Con el animal anestesiado, se procede al rasurado y desinfección del abdomen, para realizar una laparotomía media infraumbilical, mediante una incisión de aproximadamente unos 3 cm de longitud (fig. 1).



Figura 1 Campo operatorio microquirúrgico y preparación del segmento uterino para el autotrasplante.

Tras conseguir una adecuada exposición y observación de los cuernos uterinos (fig. 1), tomamos el cuerno izquierdo y medimos, por medio de una regla estéril milimetrada, 15 mm, desde el cuello uterino hacia el infundíbulo, donde realizamos una incisión transversal de las tres capas histológicas (serosa, muscular y mucosa endometrial) del cuerno, pero manteniendo la vascularización mesometrial. A 5 mm de dicha incisión, practicamos otra de las mismas características, para obtener el segmento que nos servirá de implante (fig. 1).

La superficie antimesentérica del segmento así obtenido es seccionada longitudinalmente en todo su espesor (fig. 2),



Figura 2 Sección completa antimesentérica del segmento uterino, aislado para el autotrasplante.



Figura 3 Autotrasplante del fragmento uterino, envolviendo parcialmente la cicatriz resultante de la anastomosis térmico-terminal, de donde procede el fragmento.

consiguiendo una exposición total de la mucosa endometrial. Seguidamente, los extremos resultantes del cuerno uterino izquierdo, son anastomosadas térmico-terminalmente, mediante una sutura seromuscular de ácido poliglicólico 8/0, necesitando 5-6 puntos. Dicha anastomosis, es cubierta a su vez por la mucosa endometrial del segmento («del mismo modo que una salchicha es envuelta por el pan en un perrito caliente», por este motivo denominamos al implante «PGR-1 hot dog»).

Los bordes antimesentéricos del implante se suturan, con 4 puntos seromusculares (dos en cada lado), con sutura de ácido poliglicólico de 8/0, al cuerno anastomosado, de manera que quede implantado el segmento cubriendo parcialmente la anastomosis térmico-terminal, evitando una compresión excesiva que pudiera dañar el contenido envuelto (fig. 3).

Una vez realizado el implante, se procede a la desvascularización del mismo mediante una electrocoagulación bipolar (figs. 4 y 5).



Figura 4 Desvascularización del fragmento uterino con coagulación bipolar tras finalizar el autotrasplante.

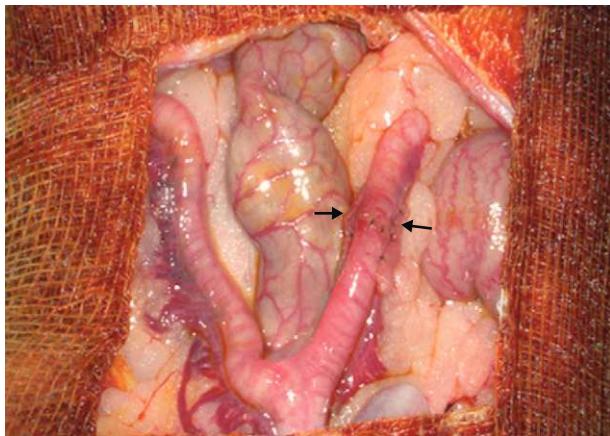


Figura 5 Aspecto final del autotransplante PGR-1 *hot-dog* alrededor del cuerno uterino izquierdo.

Finalmente, se cierra la laparotomía sutura continua de ácido poliglicólico de 4/0 para la fascia y 5-6 puntos de seda de 3/0 para la piel.

Tras las intervenciones todos los animales recibieron el siguiente tratamiento:

- Profilaxis antibiótica con cefazolina 1 mg/rata. Durante tres días consecutivos.
- Analgesia con meloxicam 0,08 mg/rata. Durante tres días consecutivos.

- Anestesia local en bordes de la herida con 1 cc de bupivacaína. Una sola infiltración después de haber realizado la intervención microquirúrgica.

Segunda laparotomía

Ocho semanas después del procedimiento de inducción de endometriosis, se procede a realizar la segunda laparotomía en todos los animales.

Una vez identificado el implante, se comprueba su aspecto macroscópico observando su coloración, presencia de adherencias o necrosis. Se revisa toda la cavidad abdominal y finalmente se realiza una histerectomía y anexectomía bilateral, para estudio anatomo-patológico.

Por último, se procede al sacrificio del animal anestesiado, con sobredosis de pentobarbital sódico vía intracardíaca.

Material para estudio anatomo-patológico

Aparato reproductor de 11 ratas hembra con inducción microquirúrgica experimental de endometriosis.

Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10% neutro durante 24 h y transferidas posteriormente a etanol 70°. De este material se obtuvieron secciones longitudinales del cuerno derecho, del cuerno uterino izquierdo y de zona de vagina y unión de ambos cuernos uterinos. Estas muestras fueron procesadas por métodos histológicos rutinarios.

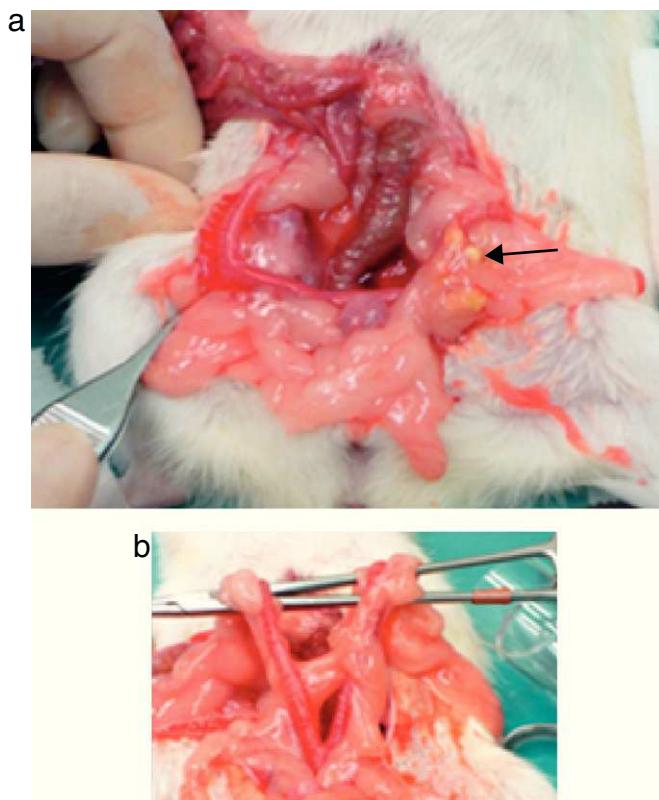


Figura 6 A) Vesículas amarillentas. B) Adherencias en la zona próxima al implante.

narios, obteniéndose secciones a 3 μm que fueron teñidas con el método de hematoxilina-eosina (HE).

Resultados

Hallazgos macroscópicos

En los 11 animales, a las ocho semanas del autotrasplante uterino, al inspeccionar la cavidad peritoneal nos encontramos, en mayor o menor grado, en todos los animales:

- Vesículas amarillentas (fig. 6A).
- Adherencias sobre el intestino y la grasa mesometrial (fig. 6B).

Estas lesiones afectaban principalmente al cuerno uterino sometido al implante.

Hallazgos microscópicos

En los 11 animales, comparando los hallazgos microscópicos con el cuerno uterino normal, donde distinguimos las capas histológicas: mucosa, muscular y serosa (fig. 7A), apreciamos en la zona del implante del cuerno autotrasplantado, una vesícula/quiste de paredes aplanadas, con todas o algunas de las capas histológicas (fig. 7B).

También encontramos una intensa vascularización que no solo afectaba a la zona del implante (fig. 8A), sino también a la bolsa ovárica y al cuerno uterino y bolsa ovárica contralaterales.

Otro de los hallazgos microscópicos que nos llamó la atención fue la observación de una dilatación de la bolsa ovárica, sin existir obstrucción del cuerno uterino, tanto en el lado intervenido como en el contralateral, con una marcada angiogénesis (fig. 8B).

También apreciamos una reacción inflamatoria peritoneal, con aumento de la vascularización y aparición de micromineralizaciones, localizada fundamentalmente en la zona de grasa mesometrial próxima al implante.

La zona de unión de ambos cuernos uterinos, así como la vagina presentaban aspecto normal y no hemos encontrado

células endometriales recubriendo las vesículas amarillas más lejanas al implante.

En 1 de los 11 animales, distinguimos glándulas y estroma endometriales entre los haces musculares desorganizados, en la zona de cuerno uterino donde asentaba el autotransplante (fig. 9).

Discusión

Así como la endometriosis es una enfermedad relativamente frecuente en mujeres en edad reproductiva, en animales es rara. Quizá sea también más difícil de diagnosticar, como explica Ortega^{5,6}.

Teniendo en cuenta la teoría de la menstruación retrógrada, como causa de la endometriosis, en animales este fenómeno es más difícil de producirse, ya que en muchos de ellos existe una bolsa ovárica que facilita la captación ovular y aísla el peritoneo pélvico de los fluidos uterinos. Además, la menstruación como tal fenómeno solo se produce en las monas. Por este motivo los primates son los modelos animales ideales para el estudio y la investigación de endometriosis en humana, pero debido a su alto coste, problemas éticos y difícil manejo se han propuesto otros modelos animales, de los que la rata Wistar es uno de los más utilizados.

Desde que Vernon y Wilson¹ describieran la técnica microquirúrgica para inducir la endometriosis en rata Wistar, otros autores^{6,7} han introducido variantes de la misma como:

- Localización anatómica del implante.
- Composición del mismo: serosa, muscular, mucosa; o solo mucosa.

En nuestro trabajo, la variación ha consistido en el lugar de colocación del implante. Este lo situamos alrededor de una cicatriz uterina del cuerno izquierdo, producida por la obtención del implante (fragmento uterino que contenía serosa, muscular y mucosa uterina). El motivo era intentar averiguar si, además de una endometriosis externa, se podría producir además una endometriosis interna.

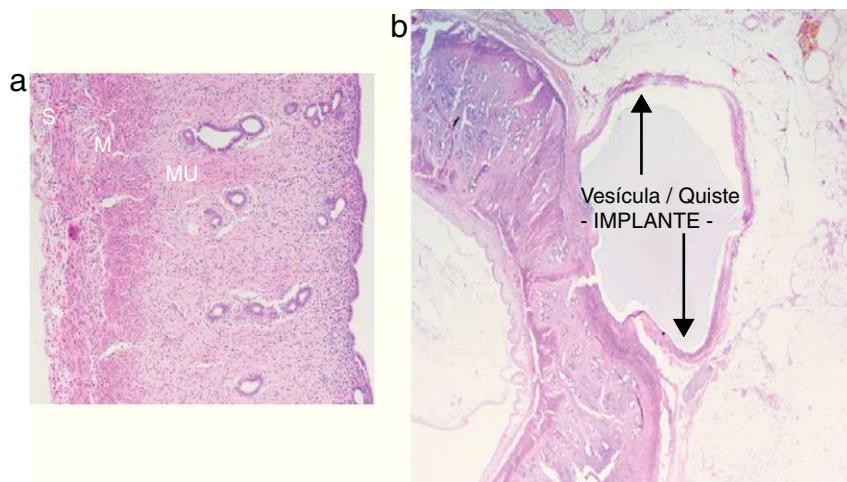


Figura 7 A) Cuerno uterino normal. B) Implante que ha formado una vesícula/quiste. MC: muscular; MU: mucosa; S: serosa.

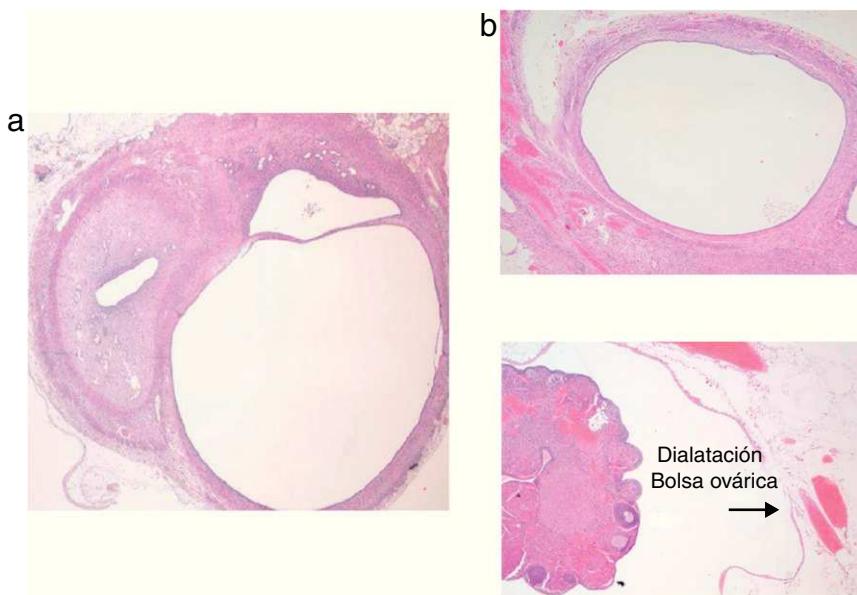


Figura 8 A) Autotrasplante (vesícula/quiste) con neovascularización en su periferia. B) Dilatación de la bolsa ovárica con marcada hiperemia.

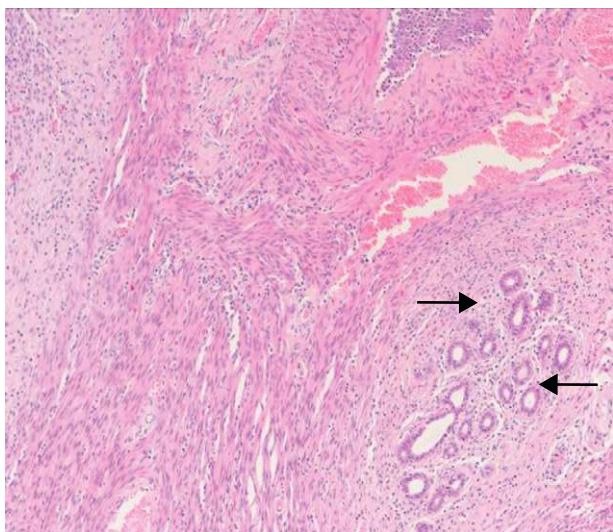


Figura 9 Haces musculares desorganizados entre los que se ven glándulas endometriales.

La endometriosis inducida en rata Wistar viene definida:

- Macroscópicamente, por la aparición de vesículas amarillentas, además de presencia de procesos adherenciales. En nuestro modelo se cumple este precepto. Así, como Quereda⁷ hemos hallado, además del proceso adherencial, vesículas conteniendo líquido estral amarillento, rodeadas o no de las capas uterinas que constituyan el fragmento autotrasplantado.
- Microscópicamente, se encuentran vesículas/quistes, fenómenos inflamatorios y marcada neoangiogénesis. Estos procesos están localizados fundamentalmente en la zona del implante o próximos a él. En nuestro caso, hemos hallado estos fenómenos y además una neoangiogénesis en localizaciones más distales al implante, como

en las zonas anexiales que además presentaban una dilatación de la bolsa ovárica, sin existir obstrucción del cuerno uterino. Este hecho hablaría a favor de la existencia de substancias proinflamatorias, en respuesta a la presencia de un elemento extraño por su localización, el implante uterino, con probable implicación de los macrófagos peritoneales⁸ y las citocinas⁹ por ellos liberadas, fundamentalmente el factor de necrosis tumoral y el factor de crecimiento endotelial vascular¹⁰. Alcázar¹¹ también describe este fenómeno de la angiogénesis en humana, al observar un incremento de la vascularización durante la exploración ecográfica de los ovarios de mujeres con endometriomas, con una relación directa con la presencia de dolor pélvico, en relación a las que no presentaban endometriomas ováricos.

Otra diferencia en nuestro trabajo, en relación con otras técnicas de inducción de endometriosis en rata Wistar es: la posibilidad de estudiar la endometriosis interna o adenomiosis. Pensamos que este hecho diferencial pueda estar motivado por el tipo de implante, que abrazado a la cicatriz puede desarrollar una endometriosis interna. En nuestro estudio, solo ha ocurrido en uno de los animales, mientras que la aparición de vesículas y la angiogénesis se han producido en todos los modelos descritos. Serían necesarios por tanto más estudios y aplicar métodos estadísticos para confirmar el implante PGR-1 *hot dog* como método válido, para producir endometriosis interna en rata Wistar.

La intención final de este trabajo, tras validar el implante, como así parece al compararlo con los resultados de inducción de endometriosis en rata wistar, obtenidos por otros autores^{1,6,7}, sería ver cómo responde a las nuevas terapias desarrolladas para curar la enfermedad endometriótica en humana, aliviar el dolor que produce o mejorar las posibilidades de fertilidad en la mujer que la padece, tanto de forma natural, como utilizando técnicas de reproducción asistida¹².

Conclusiones

Por tanto, en cuanto a nuestro trabajo con este modelo de inducción de endometriosis: interna y externa, que denominamos PGR- 1 *hot dog* creemos más que posible la siguiente secuencia de hechos.

1. El implante PGR-1 permanece viable y responde a las hormonas ováricas. Es decir, se revasculariza y no se necrosa.
2. El líquido estral generado por la mucosa uterina del implante se vierte al peritoneo y a la sutura termino-terminal, ocasionando una reacción inflamatoria.
3. La reacción inflamatoria producida por el vertido de líquido endometrial en peritoneo entre otros, provocaría una peritonitis local, una neoangiogénesis local y a distancia, desencadenando un aislamiento del implante por la grasa miometrial, vejiga e intestino, que impediría finalmente la salida de más líquido estral.
4. El líquido estral a distancia forma las vesículas más amarillentas, más densas, hipotéticamente el líquido más antiguo.
5. El líquido estral acumulado en el implante va adelgazando el mismo, ya que se ha taponado su salida por el mecanismo anteriormente descrito, ocasionando un adelgazamiento de la pared de implante que formaría una vesícula que contendría un líquido más seroso, menos amarillento y que alcanzada una presión determinada impediría finalmente el funcionamiento de la mucosa uterina o produciría su fragmentación, liberando el contenido. Por este motivo, a veces no visualizamos el implante completo.
6. El líquido estral proveniente de los cuernos uterinos, incluido el cuerno uterino izquierdo abrazado por el implante, drenaría por su espacio natural, sin ocasionar dilatación intraluminal. Por tanto, creemos que la hiperemia y la dilatación de los ovarios en algunas ratas y dado que se producen también a veces en el ovario contralateral al lado del implante, se produciría por el líquido estral del implante y no como consecuencia de la obstrucción del cuerno uterino. Este hecho nos parece relevante por el especial tropismo que muestran las células endometriales sobre el ovario y trompa, lugares de frecuente localización de endometriosis en humana.

Este nuevo tipo de autotransplante uterino en rata Wistar nos puede ayudar a entender mejor los mecanismos fisiopatológicos implicados en la aparición de la endometriosis: interna y externa.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Al equipo de microcirugía: Dra. González Pastor, Dra. Pastor Oliver y al Dr. Gómez-Arrue Azpiazu.

Al personal del Servicio de Biomedicina y Biomateriales de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza: Alicia Arnal Ortiz, Aurora García Encina, Luís Mórgica Lozano, Carmen Navarro Lapeña y María Pérez Palomero.

A la Unidad de Apoyo a la Investigación, Anatomía Patológica: Dra. Alba de Martino Rodríguez.

A la Unidad de Apoyo a la Investigación y Separación Celular: Dr. J. Godino.

Bibliografía

1. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril*. 1985;44:684–94.
2. Ayala Yáñez R, Mota González M. Endometriosis: fisiopatología y líneas de investigación (primera parte). *Ginecol Obstet Mex*. 2007;75:477–83.
3. Oktem M, Esinler I, Eroglu D, Haberal N, Bairaktar N, Zeineloglu H. High-dose atorvastatin causes regression of endometriotic implants: a rat model. *Hum Reprod*. 2007;22:1474–80.
4. Triantafillidis JK, Papalois AE, Parasi A, Anagnostakis E, Burnazos S, Giteas A, et al. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. *World J Gastroenterol*. 2005;11:6843–7.
5. Ortega J. Receptor concentrations for estradiol and progesterone in surgically induced endometriosis in the rat. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*. 1994;54:123–6.
6. Ortega J. Comparación de dos técnicas para inducir la endometriosis experimental en la rata. *Clin Inv Gin Obst*. 1994;21:54–9.
7. Quereda F, Barroso J, Acién P. Endometriosis inducida en rata Wistar: avances en la caracterización del modelo experimental. *Prog Obst Gin*. 1995;38:111–7.
8. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2005;147:1278–86.
9. Umezawa M, Sakata C, Tanaka N, Kudo S, Tabata M, Takada K, et al. Cytokine and Chemokine expression in a rat endometriosis similar to that in human endometriosis. *Cytokine*. 2008;43: 105–9.
10. García-Manero M, Alcazar JL, Toledo G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ovarian endometriosis: correlation between VEGF serum levels, VEGF cellular expression, and pelvic pain. *Fertil Steril*. 2007;88:513–5.
11. Alcázar JL, García-Manero M. Ovarian endometrioma vascularization in women with pelvic pain. *Fertil Steril*. 2007;87: 1271–6.
12. Landazabal A, Villasante A, Scheffer B, Arbués J, Requena A, Giles J, et al. Endometriosis y técnicas de reproducción asistida. En: Remohí J, Simón C, Pellicer A, editors. *Reproducción Humana*. Aravaca: Mc GrawHill; 2002. p. 221–5.