



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Química Biológica

**Alternativas terapéuticas de origen natural para la
endometriosis.
Evaluación de su acción sobre el tejido
endometrial ectópico.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Química Biológica

Bárbara Andrea Mc Cormack

Directora de tesis: **Dra. Rosa Inés Barañao**

Consejero de Estudios: **Dr. Juan Carlos Calvo**

Lugar de trabajo: **Laboratorio de la Inmunología de la Reproducción**

- Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) - CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina - Marzo de 2020

Alternativas terapéuticas de origen natural para la endometriosis. Evaluación de su acción sobre el tejido endometrial ectópico.

RESUMEN

La endometriosis (EDT) es una de las enfermedades ginecológicas benignas más comunes en mujeres en edad reproductiva y se define por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina.

Debido a la cuestionada eficiencia de la terapéutica actual y basándonos en trabajos previos de nuestro grupo, orientamos la búsqueda de terapias alternativas hacia compuestos naturales que puedan administrarse por períodos prolongados sin causar efectos adversos.

El objetivo general de esta tesis consistió en evaluar el efecto del ácido elágico y dos de sus metabolitos, urolitina A y B; sobre el crecimiento de lesiones endometriósicas en un modelo murino de EDT. Asimismo, se evaluaron sus efectos sobre el crecimiento y comportamiento de células epiteliales y estromales endometriales *in vitro*.

Los resultados obtenidos resultan prometedores ya que todos los tratamientos, especialmente con los metabolitos, provocaron efectos inhibitorios sobre el comportamiento celular y el desarrollo de la EDT, *in vitro*; así como las urolitinas demostraron tener efectos antiproliferativos y proapoptóticos *in vivo*.

Estos resultados avalan continuar investigando los mecanismos de acción de estos compuestos, ya que podrían representar una nueva estrategia terapéutica potencial para el tratamiento de la EDT.

PALABRAS CLAVE: Endometriosis – Compuestos Naturales – Ácido Elágico
– Urolitinas – Proliferación Celular – Apoptosis - Migración – Invasión

Therapeutic alternatives of natural origin for endometriosis. Evaluation of its action on ectopic endometrial tissue.

ABSTRACT

Endometriosis (EDT) is one of the most common benign gynecological diseases in women of reproductive age and is defined by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity.

Due to the questioned efficiency of the current therapeutics, and based on previous work made by our research group, we focused our searching of alternative therapies towards natural compounds that can be administered for prolonged periods without causing adverse effects.

The general objective of this thesis was to evaluate the effect of ellagic acid and two of its metabolites, urolithin A and B, on the growth of endometriotic lesions in a murine EDT model. Its effects on the growth and behavior of endometrial stromal and epithelial cells were also evaluated *in vitro*.

The results obtained are promising because all treatments, especially metabolites, caused inhibitory effects on cell behavior and the development of EDT *in vitro*; Urolithins also showed antiproliferative and proapoptotic effects *in vivo*.

These results support further research into the mechanisms of action of these compounds, as they could represent a potential new therapeutic strategy for the treatment of EDT.

KEYWORDS: Endometriosis - Natural Compounds - Ellagic Acid - Urolithins
- Cell Proliferation - Apoptosis - Migration - Invasion

AGRADECIMIENTOS

A mamá y papá. A papá y mamá. Por ser el principio de mi todo. Por apoyarme siempre y creer en mí. Por enseñarme que mi camino está donde esté mi felicidad, y sin importar nada ellos me van a acompañar. Los amo infinitamente.

A Lu, la mejor hermana del mundo mundial. Por ser tan “sociales” y yo tan “exactas”. Por escucharme y aconsejarme incluso cuando no entendés de qué te hablo. Porque el amor eterno existe y lo comparto a diario con vos.

A Carlotto, por bajarme a la tierra y mostrarme que las cosas pueden ser simples. Por invitarme a pisar el freno y contemplar.

A Bowie, por ser EL compañero más fiel.

A De, por saber leerme aún a kilómetros de distancia. Por tus palabras tan precisas y amorosas. Por ser la loca viajera que me pone en eje cuando se me nubla la vista.

A Dani y Noe, por ser esas amigas sororas que me abrazan el alma y me ayudan a ser mejor persona cada día. Cambiaron por completo mi forma de ver y de verme. Sin ustedes no lo hubiera logrado.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigxs facultativxs. Gracias por traspasar las fronteras de la UBA y acompañarme en este largo camino.

A Inés, por abrirme las puertas de su laboratorio para que juntas transitáramos esta etapa tan importante en mi formación profesional.

Al 406!! Mis compañeros del pasado, del presente y de siempre. A Lu, Tati y Juani, por tantas risas compartidas. A Mariel, por estar siempre para lo que necesitara y por tú filosa sinceridad. A Ani por su apoyo incondicional. A Carli, por ser mi ejemplo de científica y persona. Gracias a todes por soportarme aún más de lo que yo misma me soporto.

A Gabriela, Martin Götte y MOMENDO. Por darme la oportunidad de participar en la mayor experiencia de crecimiento profesional y personal que me brindó el doctorado.

A mi consejero de estudios, el Comité de seguimiento de tesis, y a las juradas María Laura Ribeiro, Andrea Randi y Claudia Perez Leiros. Por su amable predisposición sin los que no hubiera podido cumplir con los requisitos para finalizar esta importante etapa de mi vida.

A la Universidad de Buenos Aires y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por ser pública y gratuita. Por enseñarme que la educación no se vende, se defiende.

A mamá y papá...

*“...Hay que seguir soñando
hasta abolir la falsa frontera entre lo ilusorio y lo tangible,
hasta realizarnos y descubrir que el paraíso perdido está ahí,
a la vuelta de la esquina.”*

Julio Cortázar

ABREVIATURAS

12Z: Immortalized Human Endometriotic Cell Line

AA: Antibiótico-antimicótico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AINEs: Drogas anti-inflamatorias no esteroideas

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASRM: Sociedad Americana de Medicina Reproductiva

BSA: Albúmina sérica bovina

CDK1: Quinasa dependiente de ciclina 1

CM: Medio condicionado

COX-2: Ciclo-oxigenasa 2

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína

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

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECC-1: Línea celular epitelial de carcinoma endometrial

Ect: Ectópico

Endometriosis: EDT

ER: Receptor de estrógenos

ER α : Receptor de estrógenos alfa

ER β : Receptor de estrógenos beta

Eu: Eutópico

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

H2DCF: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

H2DCF-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

IFN- γ : Interferón gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleuquina

i.p. : Intraperitoneal

MC: Medio condicionado

MEM-DVAL: Medio de cultivo MEM Eagle D-Valine modificado

MMPs: Metaloproteasas

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

Nf- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B
activadas

NK: Linfocitos citotóxicos naturales

PBS: Buffer fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa en
tiempo real

SEM: Error estándar de la media

SFB: Suero fetal bovino

St-T1b: telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line

TA: Temperatura ambiente

T-HESC: Línea celular de células estromales endometriales humanas
inmortalizadas con hTERT

TIMP-1: Inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo 1

TUNEL: Marcación de extremos 3'OH de ADN con desoxiuridinatrifosfato
catalizada por la enzima TdT (del inglés, TdT-mediateddUTP Nick-
EndLabelling)

UA: Urolitina A

UB: Urolitina B

v.o.: Vía oral

LISTA DE FIGURAS y TABLAS

<i>Figura i.1: Clasificación de la EDT.</i>	3
<i>Figura i.2: Clasificación ENZIAN de las lesiones de EDT profundas.</i>	5
<i>Figura i.3: Diagrama de los sitios comunes de implantación de lesiones endometriósicas.</i>	6
<i>Figura i.4: Esquema de la Teoría de la implantación propuesta por Sampson.</i>	8
<i>Figura i.5: Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.</i>	20
<i>Figura i.7: Estructura química de UA y UB.</i>	31
<i>Tabla i.1: Resumen de efectos asociados a las Urolitinas</i>	34
<i>Tabla m.1: Características de las biopsias endometriales (Buenos Aires)</i>	43
<i>Tabla m.2: Características de las biopsias endometriales (Münster).</i>	44
<i>Tabla m.3: Características de las biopsias endometriales para Medios Condicionados (Buenos Aires).</i>	53
<i>Figura m.1: Sistema de Invasión por inserto BioCoat Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences).</i>	57
<i>Figura m.2: Identificación del ciclo estral por citología vaginal.</i>	63
<i>Figura 1.1: Efecto del AE sobre la proliferación de células endometriales.</i>	71
<i>Figura 1.2: Efecto del AE sobre la progresión del ciclo celular en cultivos de células endometriales.</i>	73
<i>Figura 1.3: Efecto del tejido endometrial sobre la adhesión de células endometriales.</i>	76
<i>Figura 1.4: Efecto del AE sobre la adhesión celular.</i>	78
<i>Figura 1.5: Efecto del AE sobre la migración celular.</i>	79
<i>Figura 1.6: Análisis del ciclo estral en el modelo in vivo de EDT.</i>	82

<i>Figura 1.7: Efecto del AE sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas.</i>	83
<i>Figura 2.1: Efecto de las urolitinas sobre la proliferación de células endometriales.</i>	89
<i>Figura 2.2: Efecto de las urolitinas sobre la progresión del ciclo celular en cultivos de células St-T1b y 12Z.</i>	91
<i>Figura 2.3: Efecto de las urolitinas sobre la apoptosis de cultivos de células St-T1b y 12Z.</i>	92
<i>Figura 2.4: Efecto de las urolitinas sobre la adhesión celular de cultivos de células St-T1b y 12Z.</i>	94
<i>Figura 2.5: Efectos de las urolitinas sobre la migración celular de cultivos de células St-T1b y 12Z.</i>	95
<i>Figura 2.6: Efecto de las urolitinas sobre la invasión de cultivos de células y 12Z.</i>	96
<i>Figura 2.7: Efecto de las urolitinas sobre la expresión de genes que regulan la migración celular y el crecimiento invasivo.</i>	98
<i>Figura 2.8: Análisis del ciclo estral en el modelo in vivo de EDT.</i>	101
<i>Figura 2.9: Efecto de las urolitinas sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas.</i>	103
<i>Figura 2.10: Efecto de la UB sobre la proliferación de células epiteliales y estromales en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón.</i>	105
<i>Figura 2.11: Efecto de la UB sobre la apoptosis de células epiteliales y estromales en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón.</i>	107

INDICE

RESUMEN	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iv</i>
ABREVIATURAS	<i>vii</i>
LISTA DE FIGURAS y TABLAS	<i>i</i>
INDICE	<i>iii</i>
INTRODUCCIÓN GENERAL	<i>1</i>
i.1 Patología	1
i.1.2 Clasificación.....	2
i.1.3 Etiología.	7
i.1.4 Sintomatología y diagnóstico.....	14
i.1.5 Prevalencia.	16
i.2 Tratamiento	18
i.2.1 Terapéutica actual.....	18
i.2.2 Terapias alternativas.....	25
i.3 Terapias naturales	26
i.3.1 Ácido elágico	27
i.3.2 Urolitinas	30
HIPÓTESIS y OBJETIVOS	<i>36</i>
MATERIALES y MÉTODOS	<i>39</i>

Capítulo 1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÁCIDO ELÁGICO SOBRE EL DESARROLLO DE TEJIDO ENDOMETRIAL.	68
Efecto del AE, <i>in vitro</i> , sobre la supervivencia de células epiteliales y estromales de endometrio	69
Evaluación de la proliferación de células epiteliales y estromales de tejido endometrial	69
Evaluación del ciclo celular de células endometriales epiteliales y estromales.	72
Efecto del AE, <i>in vitro</i> , sobre el comportamiento de células endometriales epiteliales y estromales.	75
Efecto del microambiente del tejido endometrial de pacientes con EDT sobre la adhesión celular.	76
Efecto del AE sobre la adhesión celular.....	77
Efecto del AE, <i>in vitro</i> , sobre la migración de células endometriales humanas.	78
Efecto del AE, <i>in vivo</i> , sobre el ciclo estral.	80
Efecto del AE, <i>in vivo</i> , sobre el volumen y número de lesiones endometriósicas.	83
Capítulo 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS UROLITINAS A y B SOBRE EL DESARROLLO DE LA EDT Y LA REGULACIÓN DE MECANISMOS INVOLUCRADOS.	86
Efecto de UA y UB, <i>in vitro</i> , sobre la supervivencia de células endometriales epiteliales y estromales.	87
Evaluación del ciclo celular de células endometriales epiteliales y estromales.	90

Evaluación de la apoptosis de células endometriales epiteliales y estromales.	91
Efecto de las urolitinas, <i>in vitro</i> , sobre el comportamiento de células endometriales humanas.	93
Efecto de las urolitinas sobre la adhesión celular.....	93
Efecto las urolitinas sobre la migración de células endometriales humanas.	94
Efecto las urolitinas sobre la invasión de células de epitelio endometrial humano.....	96
Efecto de las urolitinas sobre la expresión de genes que regulan la migración celular y el crecimiento invasivo.....	97
Efecto de UA y UB, <i>in vivo</i> , sobre el ciclo estral.	100
Efecto de UA y UB, <i>in vivo</i> , sobre el volumen y número de lesiones endometriósicas.....	102
Evaluación de la proliferación celular en las lesiones endometriósicas.	104
Evaluación de la apoptosis en las lesiones endometriósicas.....	106
DISCUSIÓN	108
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFÍA	129

INTRODUCCIÓN GENERAL

i.1 Patología

La EDT es una de las enfermedades ginecológicas benignas más comunes en mujeres en edad reproductiva y se caracteriza por la presencia de tejido de tipo endometrial (células epiteliales y estromales) fuera de la cavidad uterina (Eskenazi & Warner, 1997; Giudice & Kao, 2004). Se trata de una enfermedad inflamatoria, crónica y estrógeno dependiente (Burney & Giudice, 2012; Giudice, 2010; Vercellini et al., 2014).

Si bien es considerada una enfermedad moderna, las primeras referencias sobre síntomas asociados a la EDT datan de hace 3500 años cuando en papiros egipcios se refirieron al tratamiento para un “doloroso desorden menstrual”. No obstante, las primeras descripciones más precisas de la patología se remontan al Siglo XVIII y fueron registradas durante autopsias. A partir de las observaciones de cadáveres concluyeron: que se trataba de una enfermedad femenina; que su aparición se daba en mayor medida luego de la primera menstruación; y que se asociaba directamente con el área uterina y especialmente con síntomas tales como dolor pélvico, infertilidad y abortos espontáneos recurrentes (Acién & Velasco, 2013; Benagiano et al., 2014).

Un siglo más tarde, en 1860, lesiones similares a quistes con estructuras epiteliales, glándulas endometriales y estroma, fueron identificadas por el médico patólogo Carl F. von Rokitansky (Rokitansky, 1860). Pero no fue hasta 1899 que el cirujano William Wood Russell de la Universidad Johns Hopkins esbozó una descripción detallada de los quistes endometriósicos proporcionando una confirmación inequívoca de la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, durante el estudio del caso clínico de

una paciente pre-menopáusica (Longo, 1979). Sin embargo, fue Sampson (Benagiano et al., 2014) el primero en demostrar actividades endometriales específicas, como la descamación en el momento de la menstruación y la decidualización en el embarazo; y quien posteriormente presentó una teoría sobre su patogénesis (Sampson, 1927a; Sampson, 1940)

i.1.2 Clasificación

El sistema de clasificación más ampliamente reconocido y aceptado hasta la actualidad, fue establecido por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM por sus siglas en inglés) (ASRM, 1997). El mismo permite la categorización de la enfermedad en 4 estadios: estadio I o EDT mínima, estadio II o EDT leve, estadio III o EDT moderada, y estadio IV o EDT severa. Dicha clasificación se basa en diferentes parámetros tales como localización sobre el útero y los ovarios, grado de adhesión, tamaño y número de las lesiones; a partir de los cuales se procede a la puntuación ponderada y a la determinación del grado de la enfermedad.

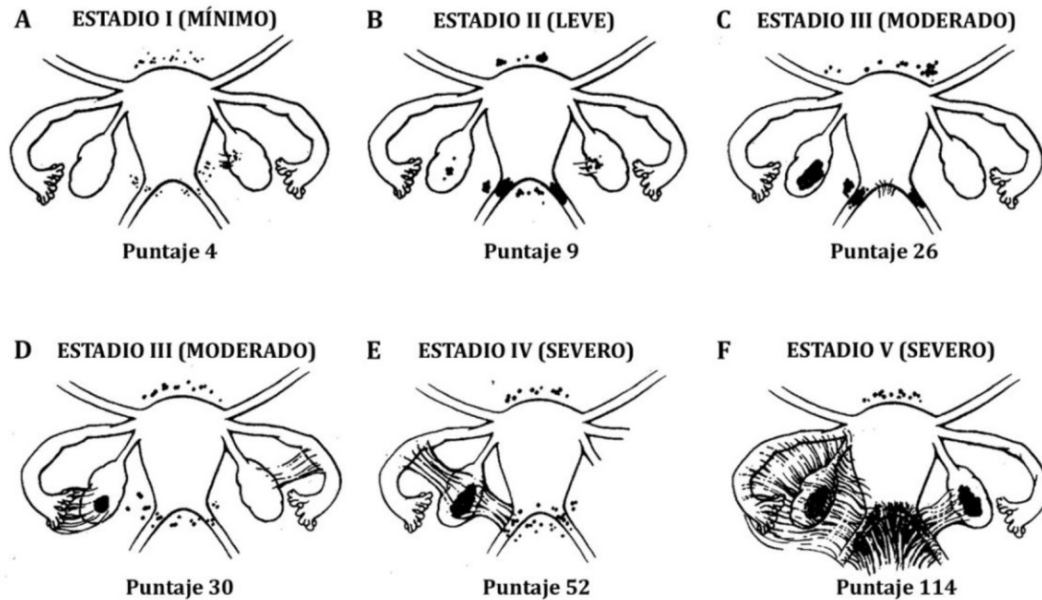


Figura i.1: Clasificación de la EDT. Esquema que ejemplifica la aplicación de la clasificación de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, basándose en la localización de lesiones y adherencias indicadas en negro. Imagen adaptada de (ASRM, 1997)

Sin embargo, dado que la gravedad de la enfermedad se evalúa simplemente describiendo los hallazgos en la cirugía laparoscópica exploratoria, dicho sistema sigue suscitando críticas debido a la escasa correlación con los síntomas y a la falta de un pronóstico predictivo. En este contexto surgieron nuevas clasificaciones basadas en parámetros no contemplados por la ASRM que buscan complementar la misma (Johnson et al., 2017). Por ejemplo, de acuerdo a la profundidad de las lesiones en los tejidos afectados, la EDT puede clasificarse en superficial o profunda. La primera se define por la presencia de lesiones superficiales, las cuales pueden ser rojas, negras o blancas según el estadio de evolución de las mismas (Nisolle & Donnez, 1997). Por otro lado, la EDT profunda se define por implantes de tejido fibromuscular con escaso tejido glandular y

estromal, sin epitelio en la superficie; cuya profundidad supera los 5mm (Johnson et al., 2017; Kennedy et al., 2005; Nisolle & Donnez, 1997; Park et al., 2011).

Este último tipo de EDT puede manifestarse en diversos tejidos, genitales y no genitales. El tamaño de los implantes pueden variar entre menos de 1 cm y más de 3 cm. Estas lesiones profundas infiltrantes se describen más adecuadamente al complementar la puntuación propuesta por la ASRM con la clasificación ENZIAN, la cual incluye claras ilustraciones que ayudan a una mejor detección de las mismas (Figura i.2) (Tuttles et al., 2005, 2012). Si bien aún se requiere una mayor validación por parte de grupos independientes, la clasificación ENZIAN se vuelve cada día más aceptada dentro de la opinión de los expertos, incluyendo los pertenecientes a la World Endometriosis Society y a la ESHRE (Burla et al., 2019; Haas et al., 2013).

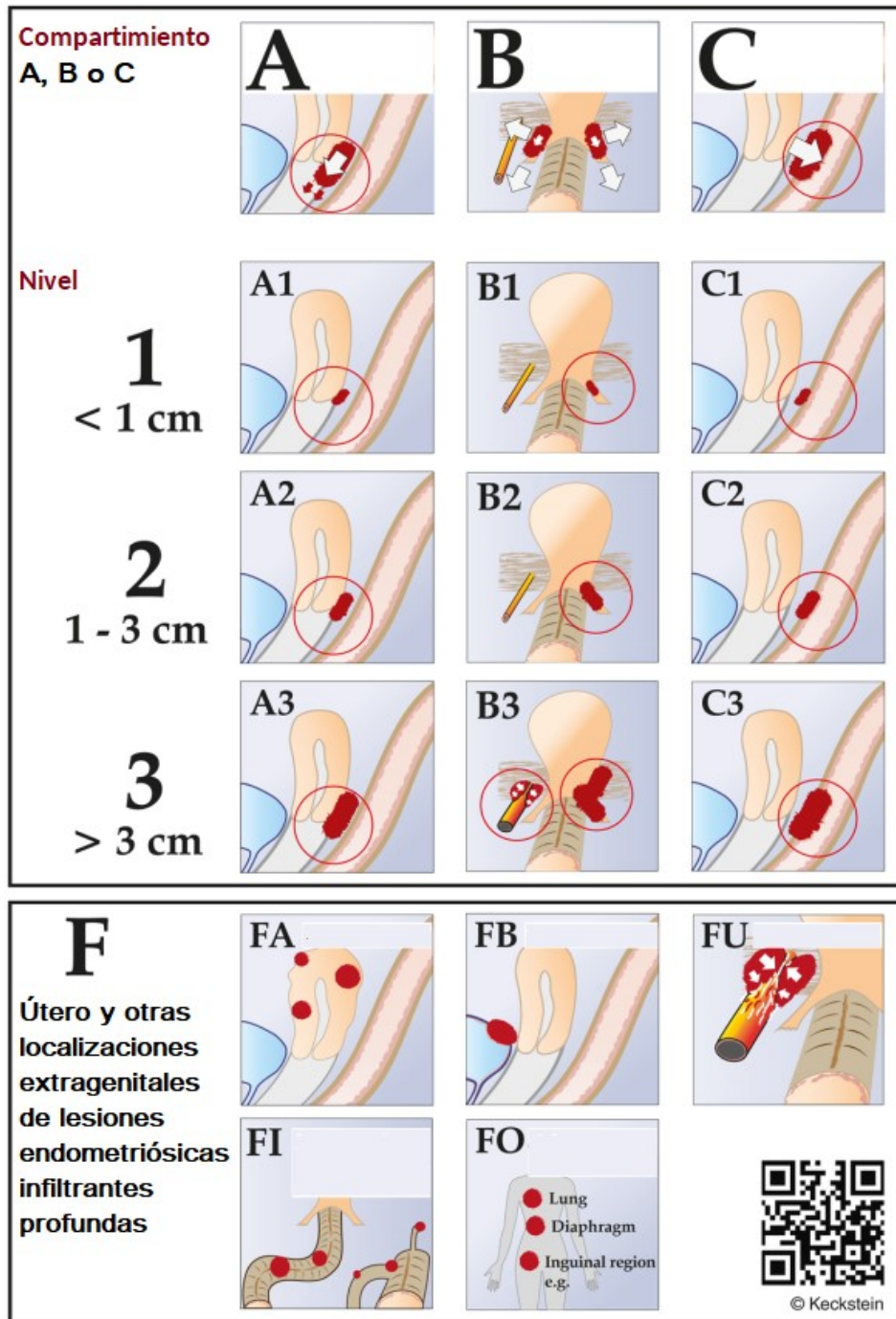


Figura i.2: Clasificación ENZIAN de las lesiones de EDT profundas. Esquema que ejemplifica la aplicación de la clasificación ENZIAN: de acuerdo a compartimiento donde se ubican las lesiones (A) tabique rectovaginal y vagina, (B) ligamentos Úterosacos hasta pared pelviana (B: unilateral y BB: bilateral), (C) recto y colon sigmoide, (FA) Adenomyosis, (FB) Vejiga, (FU) Uréter, (FI) intestino y (FO) otras localizaciones; y de acuerdo al tamaño de la lesión. Las lesiones están representadas en color rojo. Imagen adaptada de (Tuttles et al., 2012)

Otro tipo de lesiones que pueden encontrarse son los endometriomas, que son quistes ováricos de diversos tamaños con contenido oscuro generado por el sangrado del tejido endometriósico, dado que el mismo responde a hormonas (Nisolle & Donnez, 1997).

Con el fin de lograr diagnósticos más precisos de la EDT, además de los parámetros nombrados en este apartado, algunos autores proponen incluir otros en consideración, tales como índices de fertilidad y el dolor percibido por las pacientes, debido a su relevancia para un diagnóstico más preciso (Rolla, 2019).

Por otro lado es importante destacar que si bien los sitios más comúnmente afectados son los órganos pélvicos y el peritoneo; existen casos atípicos de implantes endometriósicos en sitios ectópicos como pulmón, intestino, vejiga, pleura y extremidades (Figura i.3) (Jenkins et al., 1986).

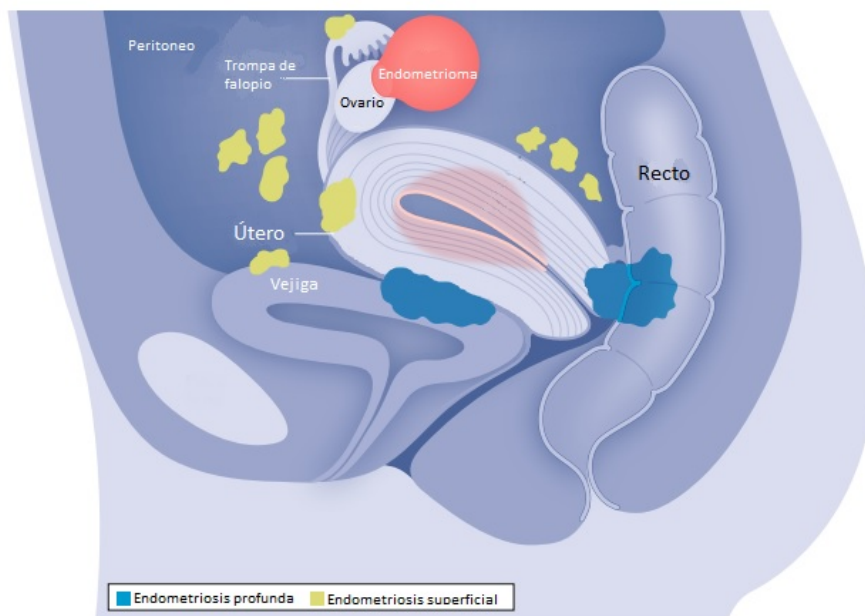


Figura i.3: Diagrama de los sitios comunes de implantación de lesiones endometriósicas. Imagen modificada de (Chapron et al., 2019)

i.1.3 Etiología.

Aún hoy, a tres siglos de las primeras descripciones, se considera a la EDT como una enfermedad enigmática con una etiología compleja. Es por eso que no sorprende que la teoría más aceptada hasta la actualidad continúa siendo la **teoría de la implantación** propuesta por Sampson en 1927, basada en la menstruación retrógrada a través de las trompas de Falopio (Sampson, 1927a). Según esta teoría, para el establecimiento y mantenimiento de las lesiones endometriósicas, es necesario que las células endometriales alcancen la cavidad peritoneal, se adhieran al peritoneo, lo invadan, vascularicen y tengan la capacidad de proliferar (Figura i.4). Por lo tanto subyace la idea de que la migración, la adhesión y la proliferación de las células endometriales, son procesos cruciales en el desarrollo de la EDT; a la vez que presupone la existencia de células endometriales viables en el fluido menstrual.

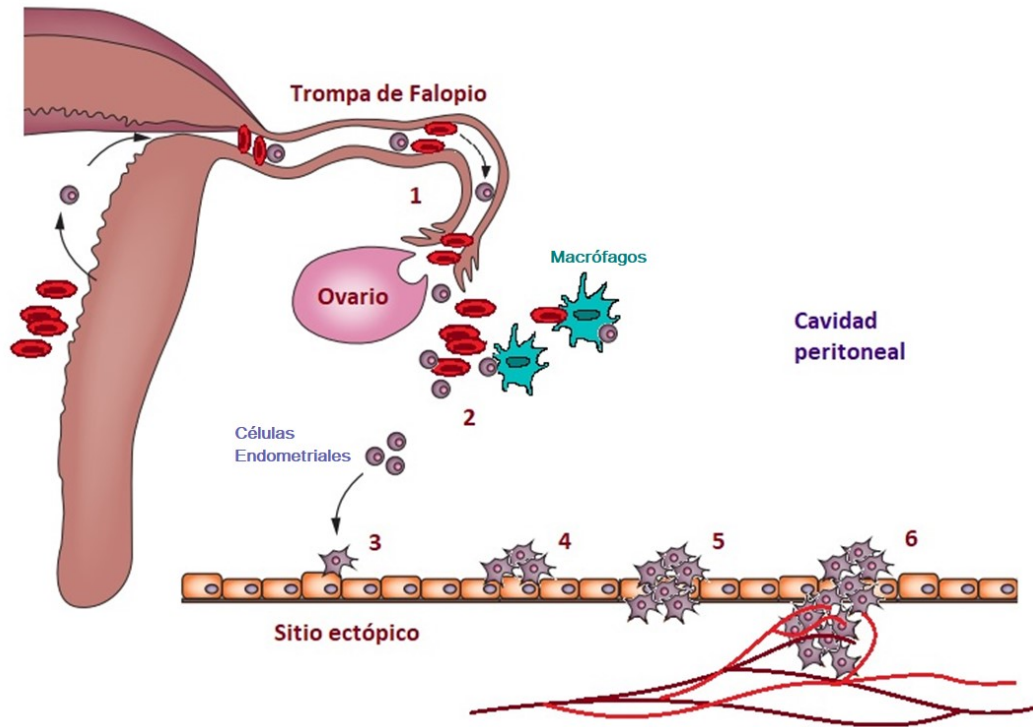


Figura i.4: Esquema de la Teoría de la implantación propuesta por Sampson. Durante la menstruación, el tejido endometrial y los eritrocitos pueden pasar a través de las Trompas de Falopio hasta la cavidad peritoneal (1). El tejido endometrial elude al sistema inmune, en particular a macrófagos peritoneales (2) y se adhiere al sitio ectópico (3), invade la matriz extracelular (4), prolifera (5) y se vasculariza (6), originando las lesiones endometriósicas. Modificado de (Vercellini et al., 2014)

Esta teoría se ve sustentada por el desarrollo espontáneo de lesiones endometriósicas en humanos y algunos primates (Emera et al., 2012), que presentan un ciclo menstrual. En ausencia de implantación embrionaria, este ciclo se caracteriza por culminar con el desprendimiento de la capa superficial del endometrio, conocido como menstruación. En ese mismo sentido, trabajos previos en babuinos (pertenecientes a los primates) esbozaron una relación entre la prevalencia de la EDT y el ciclo menstrual, concluyendo que la menstruación retrógrada es usual en estos primates, y su incidencia y recurrencia

es mayor en animales con EDT espontánea respecto a aquellos que no manifiestan la enfermedad (D'Hooghe, et al., 1996a; D'Hooghe, et al., 1996b).

El resto de los mamíferos no manifiestan flujo menstrual, por lo que atraviesan un ciclo estral donde en ausencia de implantación el endometrio es reabsorbido. Consistentemente con la teoría de la implantación de Sampson, estos animales no desarrollan la enfermedad, a menos que la misma sea inducida (Dodds et al., 2017; Uchida & Kobayashi, 2013).

A pesar de ello, la prevalencia de la menstruación retrógrada no se correlaciona en forma directa con la prevalencia de la EDT entre las mujeres en edad reproductiva (Halme et al., 1984), sugiriendo que debe haber otros factores que contribuyan a la patogénesis de esta enfermedad (Parazzini et al., 2017; Signorile & Baldi, 2010).

En los últimos años, se han descrito numerosas alteraciones tanto en el ambiente peritoneal como en el endometrio eutópico (tejido endometrial uterino) de pacientes con EDT, a diferencia de las mujeres sanas. Estas alteraciones son de naturaleza inmunológica, hormonal y de función del endometrio.

Alteraciones Inmunológicas

Entre ellas se destacan modificaciones que le permiten a las células endometriales presentes en el reflujo menstrual, no ser eficientemente reconocidas. Se postuló que en mujeres con EDT el sistema inmune es ineficiente, ya sea debido a su incapacidad de responder a los antígenos endometriales los cuales son anormales, o debido a la abundancia del reflujo que supera la capacidad de desafío de las células inmunológicas peritoneales (Izumi et al., 2018; Symons et al., 2018). Asimismo, diversas

investigaciones demostraron defectos funcionales en las células citotóxicas naturales (NK, natural killer en inglés) (Oosterlynck et al., 1991; Wilson et al., 1994; Wu et al., 2000) y linfocitos T citotóxicos (Osuga et al., 2011; Szylo et al., 2003) en pacientes con EDT. También se observó un aumento en el número y la tasa de activación de macrófagos peritoneales los cuales secretan factores de crecimiento e interleuquinas importantes para el desarrollo de la patología (Dunselman et al., 1988; Gazvani & Templeton, 2002b; Halme & Surrey, 1990; Inés Barañao, 2014; Mier-Cabrera et al., 2011; Raiter-Tenenbaum et al., 1998; Taketani et al., 1992; Vinatier et al., 1996)

Investigaciones anteriores desarrolladas en nuestro laboratorio, demostraron alteraciones en el número y la funcionalidad de los macrófagos peritoneales de pacientes con EDT leve y severa (Raiter-Tenenbaum et al., 1998) respecto de las pacientes control. Así mismo, la incubación de macrófagos normales con líquido peritoneal de pacientes con EDT, reproducían las alteraciones características de esta patología (Tenenbaum et al., 1992).

Alteraciones hormonales

Por otro lado, reportes previos demostraron que los cambios hormonales, en especial los niveles de estrógeno, correlacionan con el establecimiento y mantenimiento de las lesiones endometriósicas (Bulun et al., 2002), observándose un aumento en su concentración en el líquido peritoneal de pacientes con EDT en comparación con mujeres control (Raiter-Tenenbaum et al., 1998). También se hallaron polimorfismos asociados a la enfermedad tanto para receptores de estrógenos (ER) como para los de progesterona (PR) (Near et al., 2011; Wieser et al., 2002). Asimismo, se reveló que ER α promueve la proliferación, la adhesión y la angiogénesis, así como también modula la

señalización de la inflamación en las lesiones (Burns et al., 2012); mientras que ER β tiene un papel predominante en la supervivencia e invasión de las células endometriósicas (Han et al., 2015).

Alteraciones funcionales del endometrio

Se ha reportado que células del endometrio eutópico y células del endometrio ectópico (lesiones) de pacientes con EDT presentan diferencias en la proliferación, apoptosis, adhesión celular, perfiles inmunoinflamatorios, producción de citoquinas y perfiles de expresión génica (Ahn et al., 2016; Sharpe-Timms, 2001); entre si y en comparación con el endometrio eutópico de las pacientes control. Estos factores propios de las células endometriales generarían una mayor susceptibilidad a la implantación, crecimiento y supervivencia en un sitio ectópico, dando lugar a la formación de las lesiones.

En el mismo sentido, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que, en comparación con mujeres control, las pacientes con EDT poseen una actividad proliferativa aumentada e índices de apoptosis disminuidos. Esto se debe a un aumento significativo en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Meresman et al., 2000), y a la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la interleuquina 1 (IL-1) que disminuyen la expresión del regulador de la apoptosis Bax (Bilotas et al., 2010). Además, en otro trabajo de nuestro grupo, se reveló una mayor expresión de fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), una menor expresión de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) y mayores niveles de proteína kinasa B fosforilada (p-PKB o p-AKT), en endometrio eutópico y ectópico de pacientes con EDT respecto de pacientes control. De este modo quedaron confirmadas las alteraciones en la regulación

de la vía PI3K/AKT involucrada en numerosas funciones biológicas como proliferación celular, diferenciación y anti-apoptosis. En particular, las pacientes con EDT mínima y leve expresaron niveles de PTEN significativamente reducidos en comparación con las pacientes con EDT moderada y grave; mientras que la relación p-AKT/AKT total mostró niveles más elevados de fosforilación de la AKT en el tejido endometrial de pacientes con EDT mínima y leve. Esto evidenció las claras diferencias entre las etapas de la EDT, enfatizando la importancia de esta vía en la primera fase de la enfermedad (Madanes et al., 2019).

No obstante, resulta difícil poder determinar si las alteraciones anteriormente mencionadas son la causa o la consecuencia de la presencia de la patología.

De acuerdo a lo planteado hasta este punto, la teoría de la implantación posee un amplio consenso en la comunidad científica como mecanismo de etiología de la EDT. Sin embargo, los casos de implantación en sitios atípicos no pueden explicarse por medio de la misma, ya que el reflujo menstrual no es capaz de acceder a estos tejidos. Otras teorías proponen mecanismos alternativos de etiopatogenia posibles.

A principios del siglo XX, Meyer (Meyer, 1919) y Novak (Novak, 1931) desarrollaron la **Teoría de la Metaplasia celómica**. La misma se basa en el origen embrionario común del tejido endometrial, el tejido peritoneal y las células del epitelio superficial que recubre los ovarios; y postula que la EDT se originaría a partir de una metaplasia de la membrana celómica. Con esta teoría es posible explicar la aparición de lesiones en pacientes sin útero (Gazvani & Templeton, 2002; Rosenfeld & Lecher, 1981; Schrodt et al., 1980).

Otra de las teorías propuestas por esos años fue la **Teoría de la Propagación linfática y vascular**, mediante la cual se intentaba explicar la aparición de lesiones en

sitios remotos. La misma postula que células endometriales viables accederían al sistema linfático y/o vascular, a través del cual se diseminarían (Jensen & Coddington, 2010; Sampson, 1927b).

La teoría más reciente sobre la etiología de la EDT es la **Teoría de las células madre progenitoras**. El endometrio humano se regenera de forma cíclica cada mes, probablemente mediado por las células madre endometriales, que se cree intervienen en la angiogénesis y la regeneración del estroma (Cousins et al., 2018). Esta teoría plantea la posibilidad de que esas células madres endometriales o mesenquimales contribuyan a la patogénesis de la EDT, ya que al alcanzar la cavidad pélvica son capaces de trasladarse por el torrente sanguíneo, y bajo determinados estímulos logran adquirir el potencial de diferenciarse y formar lesiones endometriósicas (Bulun, 2009; Maruyama et al., 2010; Masuda et al., 2010). En coincidencia con esta teoría, células madre progenitoras del endometrio han sido identificadas en el fluido menstrual (Sasson & Taylor, 2008) y en las lesiones ectópicas como células clonogénicas (Chan et al., 2011; Kao et al., 2011). Si bien este dato afirma su rol en el establecimiento y la progresión de las lesiones, hasta el momento no hay reportes en los que se detecten dichas células en el líquido peritoneal de pacientes.

Teniendo en cuenta las evidencias en las que se basan las teorías mencionadas, es que creemos que lo más adecuado es considerarlas a todas como factibles, y complementarlas a fin de garantizar un mejor abordaje de la enfermedad.

i.1.4 Sintomatología y diagnóstico.

Si bien existen casos en los que las pacientes son asintomáticas o no presentan síntomas clínicos claros (Valle & Sciarra, 2003); la mayoría de ellas sufren de dolor pelviano (Stratton & Berkley, 2011) e infertilidad.

El dolor pelviano suele manifestarse en forma de: dolor pélvico crónico, dismenorrea (dolor menstrual atípico), dispareunia (dolor durante las relaciones sexuales)(Grangier et al., 2019; Murphy, 2002), disuria (dolor al orinar), y disquecia (dolor al defecar)(Vercellini et al., 2014).

A su vez, la infertilidad afecta aproximadamente a un 50% de las pacientes con EDT (Bulletti et al., 2010; Halis & Arici, 2004; Lin et al., 2018; Siedentopf et al., 2008), y un porcentaje similar de mujeres infértiles padecen la enfermedad. (Ozkan et al., 2008)

Además, en algunos casos las pacientes manifiestan sangrados anormales durante y entre sus períodos menstruales; problemas gastrointestinales como diarrea, estreñimiento o náuseas; y hasta puede ocasionar infecciones recurrentes, depresión, fibromialgia y fatiga crónica (Nnoaham et al., 2011).

Dado que los síntomas son sumamente variables (Kennedy et al., 2005) y no son específicos de la patología, podrían confundirse con complicaciones típicas de otras condiciones tanto ginecológicas como no ginecológicas.

Se han sugerido diversas teorías que intentan explicar el dolor y la infertilidad asociados a la enfermedad (Morotti et al., 2017) en base a dos ejes principales: las distorsiones anatómicas debido a las adherencias causadas por las lesiones endometriósicas (Jenkins et al., 1986; Somigliana et al., 2011); y las alteraciones inmunológicas características de la EDT (Gazvani & Templeton, 2002; Giudice & Kao,

2004; Lin et al., 2018). A pesar de ello, la relación específica entre los síntomas y el estadio continúan siendo poco clara (Stratton & Berkley, 2011).

Más allá de la forma en que el dolor se manifieste, no quedan dudas que la enfermedad afecta la calidad de vida de las pacientes (Jia et al., 2012; Marinho et al., 2018; Sepulcri & do Amaral, 2009). La misma fue definida en el año 1995 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Kuyken et al., 1995), como una construcción multidimensional de la percepción individual de la propia vida, en relación con los objetivos, expectativas, preocupaciones e inquietudes. Es importante destacar que todo ello se ve influenciado por la salud física y psicológica de cada paciente, por el grado de independencia, las relaciones sociales, los factores ambientales y las creencias personales. Lo cual nos lleva a enunciar que la EDT debe considerarse un problema de salud pública y no una enfermedad de los individuos.

A la hora de diagnosticar la enfermedad, la presencia de síntomas puede advertir al especialista, pero es insuficiente para un correcto diagnóstico dado que como se expuso anteriormente, es una patología con diferentes perfiles clínicos (Greene et al., 2009). Existen al menos 3 pasos necesarios para la identificación de la EDT: 1) la descripción de los síntomas por parte de la paciente; 2) la evaluación laparoscópica de la región en busca de lesiones, y 3) la posterior evaluación histológica de las mismas (Benagiano et al., 2014).

El hecho de que sea necesario recurrir a un método invasivo para lograr el diagnóstico certero, es en gran medida lo que impulsó la búsqueda de nuevos métodos menos invasivos como por ejemplo la valoración de marcadores moleculares en plasma

(Mabrouk et al., 2012; Mihalyi et al., 2010), técnicas de la espectrometría de masas (Kyama et al., 2011) y ecografías o resonancias magnéticas. Aunque, hasta la actualidad dichas herramientas no han logrado estandarizarse.

Resulta evidente que la falta de un método de diagnóstico no invasivo y la naturalización del dolor pelviano intenso menstrual, retrasa el estudio de sus causas, demora el diagnóstico de la enfermedad y genera falsas estadísticas a la hora de evaluar la prevalencia de la misma.

i.1.5 Prevalencia.

Respecto a la prevalencia de la EDT, los reportes informan que afecta aproximadamente al 10% de las mujeres en edad reproductiva, incrementándose hasta un 25 - 40% en mujeres con problemas de infertilidad (Child & Tan, 2001; D'Hooghe et al., 2003; Giudice & Kao, 2004; Ozkan et al., 2008) y hasta un 50% en mujeres con dismenorrea moderada o severa (D'Hooghe et al., 2003). Sin embargo, existen reportes de algunos casos llamativos de mujeres postmenopáusicas y niñas pre-púberes con anomalías uterinas que padecen de EDT (Ebert et al., 2009; Manero et al., 2009; Toki et al., 1996; Valle & Sciarra, 2003).

Es importante recordar que se trata de una enfermedad sub-diagnosticada, por lo que probablemente su prevalencia sea mayor a la calculada (Viganò et al., 2004). Este sub-diagnóstico se debe a tres causas principales. En primer lugar, al retraso en la consulta médica: en muchos casos se debe a que no presentan síntomas evidentes de la enfermedad, mientras que en otros se debe a que manifiestan dolores pélvicos menstruales intensos (Sección i.1.4), que han sido cultural e históricamente aceptados

como normales. En segundo lugar, a la superposición considerable de la sintomatología de la EDT con las de otras condiciones como el síndrome del intestino irritable e inflamación pélvica, por lo que no pueden ser considerados como un síntoma específico de la enfermedad. Y por último, a la dificultad en el diagnóstico definitivo de la EDT; dado que si bien actualmente existe la posibilidad de realizarlo mediante resonancia magnética nuclear, el único método de diagnóstico definitivo continúa siendo la laparoscopia ya que permite la extracción de tejido ectópico para su posterior evaluación histológica. Esto provoca retrasos de hasta 12 años en la confirmación de la enfermedad debido a que una intervención quirúrgica de estas características no es igualmente accesible para todas las pacientes (Ghai et al., 2019; Kennedy et al., 2005; Kiesel & Sourouni, 2019; Staal et al., 2016; Van Der Zanden et al., 2019).

Por estas razones la prevalencia exacta de la enfermedad nunca ha sido claramente establecida (Guo & Wang, 2006). Contrariamente a las conservadoras cifras citadas en párrafos anteriores, una estimación más realista sugiere unas 176 millones de mujeres con EDT en el mundo (Adamson et al., 2010; Morassutto et al., 2016; Nnoaham et al., 2011; von Theobald et al., 2016). Si bien en nuestro país no existen datos estadísticos oficiales, la Sociedad Argentina de Endometriosis estima que el número de casos en nuestro país alcanza el millón y la mayoría de las pacientes tienen entre 15 y 50 años. Además, la EDT es la causa de entre el 30-50% de los casos de mujeres infértiles en Argentina.

i.2 Tratamiento

La terapéutica actual no ofrece una cura para la enfermedad. Únicamente se enfoca en remover las lesiones, restaurar la anatomía pélvica y aliviar los síntomas (Quaas et al., 2015; Rodgers & Falcone, 2008; Vercellini et al., 2014). Por ende, la EDT resulta en una enfermedad inflamatoria crónica que requiere de un tratamiento continuo durante la etapa reproductiva de la paciente.

Son numerosos los casos de mujeres con EDT para las que no se logra una analgesia aceptable o bien los efectos secundarios las incitan a interrumpir el tratamiento. Como es de esperar, cualquiera sea la patología a tratar, es más probable alcanzar el alivio óptimo de los síntomas si se identifican y abordan adecuadamente sus mecanismos específicos, lo que también podría mejorar la selección del tratamiento, aumentando potencialmente la probabilidad de éxito del mismo. Es por eso que las terapias para la EDT se encuentran bajo constante investigación.

i.2.1 Terapéutica actual.

Dada la complejidad y la etiología multifactorial de la enfermedad, existe un gran número de opciones farmacológicas (Ferrero et al., 2018). Sin embargo, como actualmente el método de diagnóstico por excelencia es la laparoscopia, suele utilizársela también como primer tratamiento ya que permite la escisión de las lesiones y liberación de las adherencias (Kennedy et al., 2005). En este caso, la experiencia del especialista en salud y la localización de los implantes son un factor importante a la hora de planificar una cirugía, ya que de eso dependerá si la misma es conservadora

(remoción únicamente de lesiones y adherencias) o radical (ablación de órganos comprometidos) (Chapron et al., 2003; Child & Tan, 2001).

Aunque la cirugía es una estrategia de tratamiento importante, es preciso considerar sus limitaciones; pues, si bien permite la ablación de lesiones endometriósicas, no trata la causa subyacente de la enfermedad y, además, es común que debido a la remoción incompleta de las lesiones exista una alta tasa de recidivas. Según reportes previos, la tasa de recurrencia luego de los procedimientos quirúrgicos es de un 25% en los primeros 2 años posteriores a la intervención, y puede alcanzar el 50% a los 5 años (Guo, 2009).

En una segunda etapa post-operatoria, y basándose en la naturaleza estrógeno dependiente de la enfermedad (Kitawaki et al., 2002), se administran medicamentos que suprimen la ovulación y/o inducen un estado hipoestrogénico. El mismo busca prevenir las recidivas y el dolor, e incluye tratamientos no hormonales, tales como analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Brown et al., 2017); y tratamientos hormonales, como anticonceptivos orales combinados (AOC), progestágenos y análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Brown & Farquhar, 2015).

En particular, los tratamientos hormonales apuntan a la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. El mismo es de gran importancia ya que es el encargado de la modulación cíclica hormonal, y su mecanismo está definido por la acción estimulante o inhibidora del hipotálamo sobre la hipófisis a través de estas hormonas. En ese sentido, el hipotálamo libera GnRH en la adenohipófisis la cual en respuesta libera la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), las cuales

tienen como tejido diana el ovario y favorecen la ovulación al inducir la liberación de estrógenos y progesterona.

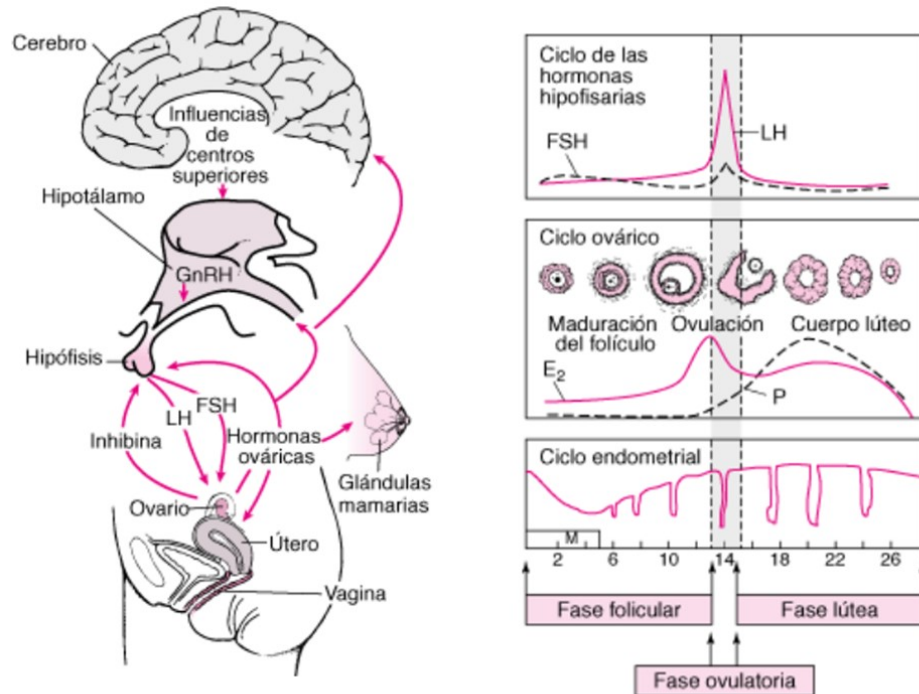


Figura i.5: Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. A) Representación esquemática de los diferentes niveles de integración del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. B) Cambios cíclicos inducidos por las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH, sobre los niveles de estradiol (E₂), de progesterona (P) y el endometrio uterino durante un ciclo menstrual. Extraído de (Knutson, 2016)

Si bien los distintos tratamientos hormonales tienen efectos similares en cuanto al alivio del dolor independientemente de su mecanismo de acción, difieren en términos de seguridad, tolerabilidad y costo (Vercellini et al., 2018).

Anticonceptivos Orales Combinados (AOC)

Los AOC suelen ser prescritos para mujeres que no buscan un embarazo y sufren de dismenorrea, ya que inhiben la ovulación disminuyendo así los niveles de gonadotrofinas.

Son de buena tolerancia, bajo costo, su impacto a nivel metabólico es menor al de otros tratamientos hormonales (Rice, 2002) y la tasa de fracaso es menor al 25%, lo cual permite administrarlos a largo plazo (Quaas et al., 2015).

Pueden utilizarse en forma continua o cíclica, aunque esta última alternativa conduce al riesgo de recurrencia de la enfermedad ya que al permitir el sangrado menstrual existen probabilidades de reflujo hacia el peritoneo (Vercellini, 2003).

En estudios realizados en nuestro laboratorio se observó que también disminuyen la proliferación celular y aumentan la apoptosis del tejido endometrial eutópico proveniente de pacientes con EDT (Meresman et al., 2002c).

Progestágenos

A partir de la observación clínica de mujeres cuyos síntomas manifestaban una resolución aparente durante el embarazo, surgió la idea de utilizar los progestágenos como tratamiento para la EDT (Moghissi, 1990).

Los progestágenos actúan regulando el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, suprimiendo la esteroidogénesis ovárica, causando la anovulación posterior y reduciendo los niveles séricos de estrógenos. Esto causa la decidualización, la aciclicidad y la atrofia tanto del endometrio normal eutópico como del ectópico (Brown et al., 2012).

Anteriormente en nuestro laboratorio se evaluó el efecto del tratamiento con Desogestrel observándose que, al igual que con los AOC, este progestágeno sintético disminuye la proliferación y aumenta la apoptosis del tejido endometrial eutópico de pacientes con EDT (Meresman et al., 2005a).

Nuevamente, este tratamiento presenta beneficios dada su buena tolerancia y accesibilidad económica, pero está dirigido a pacientes que no buscan un embarazo (Schweppe, 2001). Asimismo, su uso prolongado no es inocuo ya que estas drogas regulan los niveles hormonales sistémicos y su influencia no se limita a las lesiones sino también a otros mecanismos influenciados por ellas.

Análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

Al igual que los progestágenos, los agonistas de GnRH inhiben el eje hipotálamo-hipófisis-ovario provocando un estado hormonal similar al menopáusico. Esto reduce la actividad metabólica de la lesiones.

Es importante destacar que este tratamientos actúa a nivel global, por lo cual su uso prolongado no está recomendado dado que los efectos adversos son diversos y pueden incluir alteración del perfil lipídico de las pacientes, depresión, rubores, atrofia urogenital y pérdida de densidad ósea (Abu Hashim, 2012; Ferrero et al., 2018).

En investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de trabajo, se observó un efecto directo de los agonistas de GnRH sobre cultivos de células endometriales provenientes de biopsias de pacientes, a través del aumento de la apoptosis, la disminución de la proliferación (Meresman et al., 2003) y la disminución de los niveles de la citoquina proinflamatoria interleuquina 1 β (Il-1 β) y del factor de crecimiento endotelial vascular

(VEGF) implicado en la vasculogénesis (Meresman, et al., 2002a; Meresman, et al., 2002b).

Por otro lado, diversos estudios demostraron que uno de los mecanismos probables involucrados en el escape inmunológico se basa en la expresión del ligando proapoptótico 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 (García-Velasco et al., 2002). En vista de esto, nuestro grupo demostró que análogos de GnRH provocan el aumento en la expresión de Bax y FasL, acompañados de una disminución en la expresión de Bcl-2 (Bilotas et al., 2007). A partir de estos resultados se concluyó que los análogos de GnRH parecen ser efectivos a la hora de reducir el crecimiento de las células endometriales, no sólo gracias a sus efectos endocrinos clásicos a nivel de la hipófisis, sino también a través de un efecto directo en las propias células endometriales (Tesone et al., 2008).

Andrógenos

Los agentes androgénicos como el DANAZOL actúan suprimiendo el eje hipotálamo-hipófisis-ovario al igual que los análogos de GnRH y los progestágenos, e induciendo la amenorrea (Valle & Sciarra, 2003).

Si bien existen investigaciones que respaldan el uso del DANAZOL para aliviar el dolor asociado a la EDT (Chang & Ng, 1996; Fraser et al., 1991; Telimaa et al., 1987), el compuesto posee propiedades anabólicas lo que provoca efectos secundarios tales como ganancia de peso, mialgia, acné, piel grasa y desarrollo excesivo de vello debido a un trastorno de las glándulas suprarrenales (Rotondi et al., 2002). Es debido a esto que su uso se vio significativamente disminuido en los últimos años (Quaas et al., 2015).

Nuevos blancos terapéuticos.

Como fue planteado anteriormente, los tratamientos actuales no son del todo efectivos para calmar o curar la EDT. Además, existen estudios que demuestran que la carga económica asociada a la EDT tratada en los centros de salud es similar a otras enfermedades crónicas como la diabetes, enfermedad de Crohn o artritis reumatoidea (Simoens et al., 2012). Por esta razón, distintos grupos de investigación continúan en la búsqueda de una terapéutica más efectiva y de menor costo, que beneficie no sólo a las pacientes sino también a los sistemas de salud pública.

La búsqueda de nuevos blancos terapéuticos generó la aparición de diferentes terapias, dentro de las cuales se destacan los inhibidores de aromatasa (Bilotas et al., 2010; Meresman et al., 2005b) los inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Olivares et al., 2008), antagonistas de progesterona, moduladores selectivos del receptor de estrógenos y del receptor de progesterona, inmunomoduladores, antioxidantes e inhibidores de la angiogénesis (Barra et al., 2018; Ferrero et al., 2018; Quaas et al., 2015; Ricci et al., 2011).

Dichas terapias emergentes, se basan principalmente en la selección de eventos moleculares relevantes dentro de los mecanismos patogénicos específicos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de las lesiones endometriósicas (Bulun, 2009; Kyama et al., 2008; Reis et al., 2013; Vercellini et al., 2014). Numerosos medicamentos fueron examinados, principalmente en ensayos preclínicos, a fin de poner a prueba su capacidad teórica de interrumpir importantes vías fisiopatológicas de la enfermedad, tales como la respuesta inflamatoria, la angiogénesis, la supervivencia celular, proliferación, migración, adhesión e invasión (Soares et al., 2012).

No obstante, a pesar de que estos medicamentos podrían constituir alternativas a la terapia convencional, aún se encuentran bajo estudio ya que los efectos a largo plazo de estos fármacos sobre la fertilidad requieren más investigación.

i.2.2 Terapias alternativas.

Como mencionamos anteriormente (Sección i.1.4) el dolor es el síntoma central de la EDT y a menudo persiste a pesar del tratamiento. Esto se debe a que múltiples mecanismos subyacen al dolor asociado con esta enfermedad, incluyendo la nocicepción, la inflamación y las alteraciones en el procesamiento del dolor del sistema nervioso central y periférico (Morotti et al., 2017). Como también ocurre en otras condiciones crónicas, el dolor a menudo se asocia con la angustia psicológica y la fatiga, las cuales pueden amplificarlo. Al mismo tiempo, las pacientes suelen afrontar la sensación de no ser tomadas en serio con respecto a su experiencia y percepción personal en relación al tratamiento de sus síntomas (Schwartz et al., 2019).

Teniendo en cuenta que la EDT puede presentarse desde la primera menstruación hasta la menopausia, las pacientes buscan un plan de tratamiento a largo plazo que esté diseñado para aliviar no sólo los síntomas sino también las preocupaciones por su futuro, y que les asegure acceso ininterrumpido a una atención médica adecuada (Young et al., 2015).

Cabe destacar que a nivel mundial y para la mayoría de los ginecólogos, el tratamiento de la enfermedad consiste en la intervención quirúrgica inmediata con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. Sin embargo este enfoque debería re-pensarse

teniendo en cuenta las diversas terapéuticas actuales y las necesidades personales de cada paciente (Chapron et al., 2019).

Si bien no existe un único determinante, la crítica al sistema de salud moderno es uno de los puntos en común entre las pacientes que recurren a terapias complementarias y alternativas (Ernst, 2000). Es destacable que estas mujeres han afirmado, a partir de sus experiencias particulares, que la EDT está íntimamente asociada con retrasos en el diagnóstico, reducción de su calidad de vida y pérdida de productividad laboral (Nnoaham et al., 2011).

i.3 Terapias naturales

A través de los años, los compuestos naturales se han convertido en un recurso valioso debido a su potencial uso en el desarrollo de medicamentos para diversas patologías (Bina et al., 2019; Mehriardestani et al., 2017; Mobli et al., 2015).

Hoy en día existen numerosas bases de datos de productos naturales (SuperNatural (Dunkel et al., 2006), TCMPS (Ru et al., 2014), Phytochemica (Pathania et al., 2015)) que tienen como propósito proporcionar información acerca de sus propiedades farmacológicas, estructuras tridimensionales, interacciones con las proteínas blanco, toxicidad, absorción, distribución, y metabolismo. Aunque aún no existe una plataforma capaz de sistematizar todos descubrimientos farmacológicos de los compuestos disponibles en plantas y alimentos de consumo diario, las investigaciones respaldan la seguridad y buena tolerancia de los mismos (Chinembiri et al., 2014).

Asimismo, el tratamiento de distintos tipos de cáncer es a menudo complementado con compuestos naturales de venta libre. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los polifenoles, flavonoides y otros antioxidantes, son capaces de inhibir la proliferación, inducir la apoptosis y provocar la citotoxicidad en células cancerosas sin afectar a las células sanas (Liu et al., 2017; Liu, 2004; Moga et al., 2016; Ovadje et al., 2015; Sancho & Mach, 2014; Toklu et al., 2007). Por su parte, la EDT comparte importantes similitudes con el cáncer, como la capacidad de invadir tejidos distantes, los bajos niveles de apoptosis, la elevada tasa de proliferación celular y de angiogénesis; y los mecanismos de evasión inmunológica (Varma et al., 2004).

En vista de estos antecedentes; de la creciente incorporación de hierbas medicinales chinas (Flower et al., 2012) y suplementos dietarios (Signorile et al., 2018); y sumado a esto la imperiosa necesidad de terapias más eficientes (Barra et al., 2018), es que en nuestro laboratorio surgió el interés de buscar posibles fitoterapias para la EDT. Estas investigaciones dieron lugar a publicaciones en las que se demuestra en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de la enfermedad, la acción anti-proliferativa, proapoptótica y anti-angiogénicas del resveratrol, el galacto de epigallocatequina (EGCG)(Ricci et al., 2013), y componentes bioactivos presentes en el Romero y la *Scutellaria baicalensis* (Ferella et al., 2018).

i.3.1 Ácido elágico

El consumo de frutos rojos y otros alimentos enriquecidos en polifenoles, se ha asociado con efectos positivos para la salud a través de sus propiedades antioxidantes,

prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Liu, 2004; L. Wang & Martins-Green, 2014).

Algunos de los componentes activos de las frutillas, frambuesas, arándanos, moras y granadas (Ceci et al., 2018; Kiss & Piwowarski, 2019; Landete, 2011), son los compuestos polifenólicos, en particular los elagitaninos (ETs), que son hidrolizados para dar ácido elágico (AE) (Figura i.5) (Press & Hardcastle, 2007).

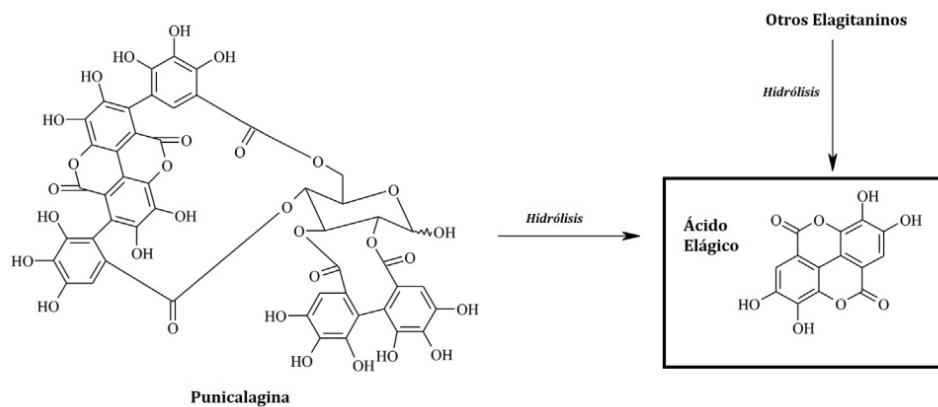


Figura i.6: Estructura química del AE. Hidrólisis de ETs para dar AE. Imagen modificada de (Nuñez-Sánchez et al., 2014)

Las propiedades del AE son numerosas (Gramec Skledar et al., 2019; Kang et al., 2016; Mele et al., 2016; Park et al., 2011; Ríos et al., 2018). Su poder antioxidante (Huang et al., 2012) es quizás la más conocida; sin embargo, su acción como agente antitumoral también ha sido demostrada en diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En líneas celulares de cáncer de próstata se observó que el tratamiento con AE fue capaz de inhibir el potencial invasivo de las células cancerosas a través de su acción sobre la actividad de la MMP-2 (Pitchakarn et al., 2013). Efectos similares fueron demostrados en cáncer de ovario, en donde el AE fue capaz de disminuir la proliferación y la migración de la línea celular A2780 a través de una disminución en los niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9; lo cual fue confirmado en un modelo *in vivo* con ratones *nude* donde se observó la inhibición del crecimiento de los tumores sin efectos adversos evidentes (Liu et al., 2017). A su vez, el AE demostró tener efectos antiproliferativos, proapoptóticos y anti-migratorios sobre diferentes células cancerosas al disminuir los niveles de ATP, pro-MMP-2, pro-MMP-9 y VEGF en líneas celulares de colon Caco-2, de mama MCF-7 y Hs 578T, y de próstata DU 145 (Lossoa et al., 2004).

Además, teniendo en consideración que la EDT es una patología dependiente de estrógenos, otro antecedente que nos llevó a considerar este compuesto como posible tratamiento es el hecho de que se ha descrito que el AE actúa como un compuesto anti-estrogénico. El receptor de estrógenos α (ER α) es uno de los blancos más estudiados en patologías estrógeno dependientes como el cáncer de mama ER+, es por eso que la búsqueda de moduladores selectivos de dichos receptores llevó a los autores a evaluar diversas estrategias incluyendo los compuestos naturales como el AE. Se ha demostrado mediante ensayos *in silico* que su estructura le otorga una alta afinidad al ER α y que es capaz no sólo de disminuir la expresión del receptor sino también de alterar las vías de señalización río abajo del mismo en ensayos *in vitro* con células MCF-7 (Pang et al., 2018). Estudios *in vivo* utilizando el modelo de cáncer de mama inducido por estrógeno en ratas ACI, confirmaron la eficacia del AE sobre este tipo de tumores al demostrar su capacidad de retrasar significativamente la morbilidad de la enfermedad, así como

también de disminuir el volumen de los tumores y su multiplicidad (Aiyer et al., 2008). Este efecto antitumoral se debe a la capacidad del AE de suprimir los niveles de enzimas que metabolizan al estrógeno durante la fase temprana de la carcinogénesis (Aiyer & Gupta, 2010).

No obstante, hasta el momento no se han reportado investigaciones *in vitro*, ni ensayos clínicos realizados en pacientes con EDT probando al AE como alternativa terapéutica.

i.3.2 Urolitinas

Un dato a destacar, es que la mayoría de los polifenoles provenientes de la dieta son transformados en el colon por la microbiota intestinal, lo cual es a menudo esencial para su absorción y modula la actividad biológica de estos compuestos (Piwowarski et al., 2014; Setchell et al., 2002). En particular, el AE es sometido a un metabolismo extenso (Espín et al., 2013; Landete, 2011; Mertens-Talcott et al., 2006; Tomás-Barberán et al., 2014) siendo transformado por el corte del anillo de lactona, la descarboxilación y las reacciones de deshidroxilación (Figura i.6) (Selma et al., 2009). Los productos finales mayoritarios de las reacciones metabólicas sobre el AE son las urolitinas A (UA) y B (UB).

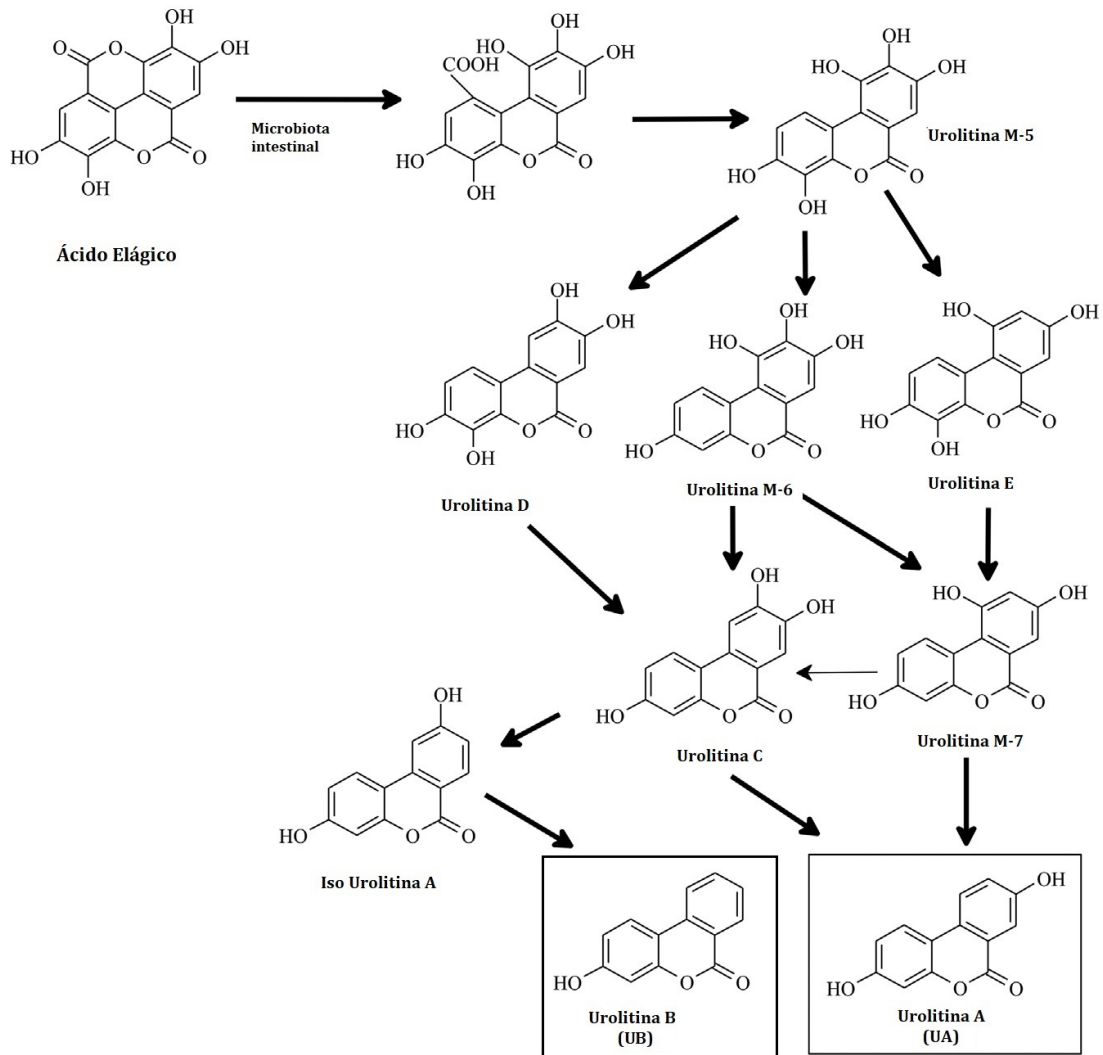


Figura i.7: Estructura química de UA y UB. Metabolismo del AE. Las flechas gruesas indican las reacciones catalizadas por la microbiota intestinal. Imagen modificada de (Nuñez-Sánchez et al., 2014)

Existe una gran variabilidad en el metabolismo del AE entre diferentes individuos, ya que los metabolitos finales dependerán de la flora intestinal de cada uno (Cerdá et al., 2005; Nuñez-Sánchez et al., 2014). Se han propuesto 3 fenotipos para clasificar la producción de urolitinas luego de la ingesta de compuestos ricos en AE: el fenotipo 0

(incapaz de producir urolitinas), el fenotipo A (únicamente produce UA) y el fenotipo B (capaz de producir la UB, UA y un isómero de UA) (Barberán et al., 2014). Este es un factor interesante a tener en cuenta en estudios epidemiológicos con alimentos que contienen AE, ya que investigaciones *in silico* demostraron que los metabolitos derivados de este compuesto ejercían actividades diferentes dependiendo de su estructura química (Dellafiora et al., 2013) por lo que los efectos biológicos podrían variar entre los pacientes dependiendo de cuales urolitinas son capaces de metabolizar. Dentro de los más abundantes se encuentran las dibenzopiranonas conocidas como UA (3,8-dihidroxi-6H-dibenzopiran-6-ona) y su análogo mono hidroxilado conocido como UB (Cerdá et al., 2004).

Como ha sido demostrado por otros grupos, el extensivo metabolismo del AE sugiere que sus metabolitos podrían ejercer efectos sistémicos debido a las altas concentraciones plasmáticas que alcanzan su máximo nivel en las 24-48h posteriores a la ingesta de ETs (Cerdá et al., 2004; Seeram et al., 2006). Ensayos *in vivo* en donde se analizaron los perfiles cromatográficos de muestras de plasma periférico y orina, indicaron que el AE es gradualmente metabolizado en el intestino y que los metabolitos se absorben preferentemente cuando su lipofilia aumenta (Espín et al., 2007).

Las investigaciones desarrolladas en los últimos años demostraron que las urolitinas ejercen una gran diversidad de efectos beneficiosos para la salud. Entre ellos se destacan sus efectos anti-inflamatorios demostrados tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de cáncer e inflamación de colon (Larrosa et al., 2010; Nuñez-Sánchez et al., 2014), diabetes (Savi et al., 2017), aterosclerosis (Mele et al., 2016) y enfermedades vasculares (Spigoni et al., 2016). Por otro lado han manifestado poseer poderosos efectos anti-oxidantes en ensayos realizados sobre diferentes modelos de investigación neurológica (células

microgliales de ratón BV2, cerebro de ratones machos con inflamación inducida por lipopolisacáridos (Lee et al., 2019) y células mielomonocíticas HL-60 (Bialonska et al., 2009)), y en células de carcinoma hepático (Wang et al., 2015) y de vejiga (Qiu et al., 2013). También resultaron ser efectivas para el tratamiento de infecciones por *Yersinia enterocolitica* (Giménez-Bastida et al., 2012); y potencialmente beneficiosas para el cáncer de próstata (Kasimsetty et al., 2010) y de colon (González-Sarrías et al., 2016). Asimismo mostraron actividad anti-estrogénica en modelos *in vitro* de cáncer de mama (Larrosa et al., 2006). La Tabla i.1 muestra un resumen de la acción de las urolitinas sobre los diferentes modelos experimentales recién mencionados.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, hasta el momento no se ha estudiado el potencial efecto terapéutico del AE ni de las urolitinas en EDT.

Tabla i.1: Resumen de efectos asociados a las Urolitinas

Efecto	Modelo	Tratamiento	Referencia
	Ratas macho Fischer con inflamación de colon inducida por dextrano de sulfato sódico (DSS)	250 mg/kg/día de extracto de granada 15 mg/kg/día de UA durante 25 días.	(Larrosa et al., 2010)
	Pacientes con cáncer de colon	Cápsulas de extractos de granada (900 mg/día por 15 días)	(Nuñez-Sánchez et al., 2014)
Anti-inflamatorio	Ratas Wistar adultas con diabetes tipo I inducida por estreptococo.	i.p. diaria de UA y UB 2.5mg/kg/día durante 3 semanas.	(Savi et al., 2017)
	Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (Modelo de aterosclerosis)	Urolitinas A, B, C, D o AE 10 µM	(Mele et al., 2016)
	Células endoteliales aórticas humanas primarias (HAECs) (Modelo de enfermedades cardiovasculares)	UA y UB 15µM o UA+UB+UBgluconidado (5µM c/u)	(Spigoni et al., 2016)
	Células microgliales de ratón BV2	UB 30, 50 y 100 µM	
	Cerebro de ratones machos ICR con inflamación inducida por lipopolisacáridos	UB 50mg/kg/día (i.p.)	(Lee et al., 2019)
Anti-oxidante	Células mielomonocíticas HL-60	Urolitinas A, B, C, D, y los derivados metilados de las urolitinas A, C y D (0.01-31.25 µg/mL)	(Bialonska et al., 2009)
	Células de carcinoma hepático HepG2	AE y UA 50-500 µM	(Wang et al., 2015)
	Línea celulares de cáncer de vejiga humana T24	AE 33.7µM, UA 43.9 µM, UB 35.2 µM, y el derivado metilado de UA 46.3 µM	(Qiu et al., 2013)
Anti-microbiano	<i>Yersinia enterocolitica</i>	UA y UB 4 µM	(Giménez-Bastida et al., 2012)
	Células de cáncer de próstata HT-29	AE, y las urolitinas A, B, C y D (12.5, 25, 50, and 100 µM)	(Kasimsetty et al., 2010)
Anti-carcinógeno	Líneas celulares de cáncer de colon humano (Caco-2, HT-29 y SW480)	MPhA: 85µM UA+ 10µM UB+ 5µM AE MPhB: 50µM IsoUA+ 30µM UA+ 10µM UB+ 5µM UC + 5µM A AE, UA, IsoUA, UB o UC: 100µM	(González-Sarriás et al., 2016)
Anti-estrogénico	Células de cáncer de mama MCF-7	UA y UB (0.1, 1, 10, 20, and 40 µM)	(Larrosa et al., 2006b)

No quedan dudas que la EDT afecta en forma significativa la calidad de vida de las mujeres que la padecen. Las pacientes concuerdan en que las falencias del sistema de salud a la hora de abordar sus experiencias respecto a la enfermedad y la ineficiente terapéutica actual, son las principales motivaciones que las conducen a considerar terapias alternativas.

De aquí que el fin último de este trabajo es encontrar nuevas alternativas terapéuticas para la EDT utilizando compuestos de origen natural que actúen en forma más directa sobre el tejido endometriósico, con efectos colaterales nulos o reducidos, que inhiban los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, y que a su vez tenga en consideración las necesidades psicosociales de las pacientes así como sus potenciales deseos de gestación.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos y la imperiosa necesidad de una terapéutica más eficiente, sin efectos colaterales evidentes, que permita la ovulación y posible fertilidad, accesible y sostenible a largo plazo; la hipótesis de este trabajo plantea que **el AE y dos de sus metabolitos, la UA y la UB, intervienen en el establecimiento, crecimiento y mantenimiento endometrial en modelos *in vitro* e *in vivo* de EDT a través de la regulación de mecanismos involucrados en la fisiopatología de la enfermedad.**

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la función del AE, la UA y la UB, en la posible inhibición del desarrollo de la EDT en modelos de la enfermedad y la regulación de mecanismos involucrados en dichos efectos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Evaluar el efecto del AE, UA y UB, *in vitro*, sobre la supervivencia de células de estroma y epitelio endometrial.**

Evaluar la proliferación, la progresión del ciclo celular y la apoptosis en cultivos primarios de células de estroma y epitelio endometrial humano provenientes de

pacientes con EDT y mujeres controles; y sobre líneas celulares estromales (T-HESCs y St-T1b) y epiteliales (ECC-1 y 12Z) tratados con distintas concentraciones de los compuestos.

- **Estudiar el efecto *in vitro* de medios condicionados provenientes de explantos de pacientes con EDT y mujeres controles, sobre la adhesión de células estromales (T-HESCs) y epiteliales (ECC-1) de tejido endometrial.**

Establecer una comparación en la capacidad de adhesión de las líneas T-HESCs y ECC-1 en presencia de medios condicionados de tejido endometrial eutópico proveniente de mujeres controles y pacientes con EDT.

- **Estudiar el efecto del AE, UA y UB, *in vitro*, sobre la migración, adhesión e invasión de líneas celulares estromales (T-HESCs y St-T1b) y epiteliales (ECC-1 y 12Z).**

1) Evaluar el efecto del tratamiento en la capacidad de adhesión de las líneas celulares estromales (T-HESCs y St-T1b) y epiteliales (ECC-1 y 12Z)

2) Evaluar el efecto del tratamiento en la respuesta migratoria de las líneas celulares estromales (T-HESCs y St-T1b) y epiteliales (ECC-1 y 12Z) mediante el ensayo de cicatrización de herida (scratch).

3) Evaluar el efecto del tratamiento con UA y UB sobre la respuesta invasiva de la línea 12Z.

- **Estudiar el efecto de UA y UB, *in vitro*, sobre la expresión génica de líneas celulares estromales (St-T1b) y epiteliales (12Z).**

Evaluar la expresión de genes relacionados con los mecanismos involucrados en el desarrollo y establecimiento de la EDT sobre células estromales de pacientes y, líneas celulares estromales endometriales (St-T1b) y epiteliales endometriósicas (12Z) tratados con UA y UB.

- **Evaluar el efecto del AE, UA y UB, *in vivo*, sobre el desarrollo de la EDT en un modelo experimental en ratonas BALB/c.**

1) Evaluar el número y tamaño de las lesiones tipo endometriósicas desarrolladas, y analizar el mecanismo de acción de las terapias según su acción sobre la proliferación celular y la apoptosis de las mismas.

2) Evaluar el progreso del ciclo estral; y la histología de ovario y útero.

MATERIALES y MÉTODOS

** Dado que parte de los experimentos in vitro de la presente tesis fueron realizados en una estadía corta de investigación en un laboratorio externo, será aclarada la metodología y permisos particulares, en aquellos procedimientos donde sea pertinente.*

Department of Gynecology and Obstetrics, Münster University Hospital, Albert-Schweitzer-Campus 1, D11, 48149 Münster, Germany.

Director: Dr. Martin Götte. Fecha: Mayo a Septiembre 2017.

Financiamiento: European Commission Horizon 2020 research and innovation programme MSCA-RISE-2015 project MOMENDO (n° 691058).

m.1 Pacientes

Para el desarrollo de este trabajo se optó por la participación de pacientes en edad reproductiva que acudían a institutos de salud (**BsAs**: Instituto Argentino de Diagnóstico y tratamiento, y Hospital de Clínicas José de San Martín; **Münster**: Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Münster) para someterse a laparoscopías diagnósticas por infertilidad, obstrucción de trompas u otra patología, y que no habían recibido tratamiento durante los últimos seis meses.

Las participantes fueron clasificadas en dos grupos:

a) Pacientes con EDT diagnosticada por laparoscopia y confirmada por estudios histológicos. El grado de EDT se determinó según “The American Society for Reproductive Medicine” (ASRM, 1997).

b) Pacientes “controles” que no padecían EDT u otra patología que pudiera alterar la población celular a evaluar.

Previo consentimiento escrito por parte de todas las pacientes, se tomaron las biopsias de endometrio (eutópico y/o ectópico) aplicando los criterios del World Endometriosis Research Foundation Epect (Fassbender et al., 2014) durante la laparoscopia con finalidades diagnósticas y terapéuticas, cediéndonos a nuestro grupo una pequeña fracción del material.

Las mismas fueron colocadas de inmediato en tubos estériles con medio de cultivo estéril como se ha descrito previamente (Meresman et al., 2000) y fueron procesadas dentro de las 24 h de culminada la cirugía.

El estudio se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el **Comité de ética del IBYME-CONICET** (CE 025-2/2012) y la **Comisión de Ética local de Westfalia** (Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms Universität; aprobación no. 1 IX Greb 1 de 2001-09-19, actualizado en 2012).

Las características de cada paciente se encuentran detalladas en tablas disponibles en cada sección según corresponda.

m.2 Aislamiento y cultivo de células epiteliales y estromales de endometrio humano

A partir de las biopsias de endometrio se realizaron cultivos primarios de células epiteliales y/o estromales endometriales. Las mismas se aislaron por medio de una disgregación enzimática del tejido y posteriores centrifugaciones sucesivas. Esta técnica ha sido optimizada y descrita en distintos trabajos científicos (Bilotas et al., 2007;

Meresman et al., 2000; Schüring et al., 2011), donde se puede obtener una descripción detallada del aislamiento.

Brevemente, una vez lavado y disgregado con material de cirugía la muestra se incubó en estufa gaseada a 37°C por 1 o 2 h con 500 µl colagenasa 1 mg/ml tipo IA (Sigma, St Louis, MO, SA) en 5 ml de Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco/F-12 de Hams (DMEM F12) conteniendo 50 µl de una solución 100 U/ml penicilina y 100 ug/ml estreptomina (Gibco) en el caso de las muestras procesadas en **Buenos Aires**; o bien 400 µl de colagenasa tipo CLS (50 mg/ml, Biochrom, Berlín, Alemania) en 500 µl de buffer fosfato salino (PBS) conteniendo 100 µl de DNasa (10 mg/ml, Sigma) en el caso de las muestras procesadas en **Münster**.

Transcurrido este tiempo se resuspendió y centrifugó a 100 g durante 5 minutos, para luego separar el sedimento (conteniendo las glándulas endometriales) del sobrenadante el cual se reservó. El sedimento se resuspendió en medio fresco y se centrifugó nuevamente a 100 g por 5 minutos. El sobrenadante se reservó junto con el del paso anterior. El sedimento final resultante de las centrifugaciones anteriores (conteniendo mayoritariamente células epiteliales) se procesó de dos formas: en el caso de las muestras procesadas en **Buenos Aires** se resuspendió e incubó por 40 minutos en estufa, para favorecer el pegado de células estromales al base de la botella de cultivo y de este modo aislar más limpiamente las células epiteliales en el sobrenadante. El mismo se centrifugó una última vez a 100 g durante 5 minutos para obtener un sedimento enriquecido en células estromales las cuales se resuspendieron y cultivaron en Medio Esencial Mínimo Eagle D-Valine modificado con L-Glutamina (MEM-DVAL) (USBiological) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco); mientras que

en las muestras procesadas en **Münster** las células epiteliales se tamizaron con un filtro celular (40 µm, Falcon, Amsterdam, Países Bajos).

Por otro lado, los sobrenadantes obtenidos y reservados de las dos primeras centrifugaciones se unificaron y centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, para obtener un sedimento enriquecido en células estromales las cuales en **Buenos Aires** se cultivaron en DMEM F12 suplementado con 10% SFB (Gibco); mientras que en **Münster** las células estromales fueron cultivadas en DMEM complementadas con 10% de SFB, 1% de glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina.

Por estudios previos de nuestro laboratorio sabemos que este protocolo de aislamiento garantiza una pureza del 85-90% (Bilotas et al., 2007).

Código de la muestra	Edad de la paciente al momento de tomar la muestra	Manifestaciones de la enfermedad	Localización de la muestra
C99a	42	EDT estadio III Endometrioma	Útero (eutópico)
C110a	28	EDT Endometrioma	Útero (eutópico)
C113a	30	EDT estadio II Endometrioma	Útero (eutópico)
C123a	33	EDT estadio II - Esterilidad Saco de Douglas	Útero (eutópico)
C126a	34	Control Esterilidad de 2 años	Útero (eutópico)
C149a	Sin datos	Control	Útero (eutópico)
C150a	40	Control	Útero (eutópico)
C151a	26	EDT estadio IV Endometrioma	Útero (eutópico)
C152a	42	EDT estadio I Vesico uterina	Útero (eutópico)
C115a	40	EDT estadio IV - Esterilidad de 4 años Endometrioma	Útero (eutópico)
C146a	36	Control	Útero (eutópico)
C147a	40	Control Esterilidad	Útero (eutópico)
C148a	34	EDT estadio III Endometrioma	Útero (eutópico)
C155a	41	EDT estadio III - Esterilidad Endometrioma	Útero (eutópico)
C164a	46	Control Pólipo endometrial	Útero (eutópico)

Tabla m.1: Características de las biopsias endometriales (Buenos Aires). Muestras utilizadas para evaluar el efecto del AE sobre la proliferación celular en cultivos primarios estromales y epiteliales. Experimentos desarrollados en Buenos Aires.

Código de la muestra	Edad de la paciente al momento de tomar la muestra	Manifestaciones de la enfermedad	Localización de la muestra
#1 -OP 5	35	- septo recto-vaginal - EDT profunda: retrocervix - vagina - útero - recto	vagina
#2 -OP 7	37	- endometrioma en ovario derecho	ovario
#3 -OP 8	33	- pared pélvica - adhesiones en receso ovarico - espacio vesico-uterino - ligamento sacro-uterino - saco de Douglas	Saco de Douglas / ligamento sacro-uterino
#4 -OP 10	19	- peri-uretral, pared pélvica - septo recto-vaginal - vagina	Pared pélvica
#5 -OP 26	35	- Intestino - ovario izquierdo - septo recto-vaginal - saco de Douglas - vagina - peritoneal (pélvica) - EDT profunda: ligamento sacro-uterino, pared pélvica	Pared pélvica
#6- OP 28	39	- diseminada con EDT profunda: peritoneo / vejiga - diseminada: pared pélvica cerca de uretra	peritoneo

Tabla m.2: Características de las biopsias endometriales (Münster). Muestras utilizadas para evaluar el efecto de las urolitinas sobre la proliferación celular en cultivos primarios estromales. Experimentos desarrollados en Münster.

m.3 Líneas celulares

Línea de células de epitelio endometrial humano (ECC-1) (ATCC CRL-2923):

Esta línea celular fue desarrollada por Satyaswaroop y colaboradores a partir de células de endometrio humano proveniente de un adenocarcinoma en ratones nude (Satyaswaroop et al., 1983). Las células ECC-1 responden al factor de crecimiento epitelial (EGF) expresando proteínas que pueden ser utilizadas para el estudio de

regulación endocrina y paracrina del epitelio endometrial *in vitro* (Mo et al., 2006); y a hormonas esteroides ya que expresan receptores de estrógenos α y β , de progesterona tipo A y B, de andrógenos, y para interferón gamma (IFN) γ (Mo et al., 2006; Tabibzadeh et al., 1990). El tiempo de duplicación de las mismas es de 26h, y han demostrado mantenerse estables luego de sucesivos pasajes por lo que constituye un buen modelo de trabajo para el estudio del comportamiento endometrial *in vitro* (Mo et al., 2006).

Las ECC-1 se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories) y piruvato de sodio 5,5 mg/ml (Sigma) (medio completo 1); y se cultivaron en frascos de 25 o 75 cm³ (Orange) con una densidad inicial entre 6x10³ y 1x10⁴ células viables por cm³. Se incubaron en estufa gaseada a 37°C con 5% CO₂ hasta una confluencia del 70-80% (aproximadamente), momento en el cual se sub-cultivaron o se sembraron para ser utilizados en los experimentos correspondientes.

Línea de células de epitelio endometriósico humano (12Z):

La línea celular endometriósica epitelial humana inmortalizada (12Z) (Zeitvogel et al., 2001) fue generada por células infectadas con el virus SV40, obtenidas de una mujer de 37 años a la que se le realizó una laparoscopia. Esta línea celular exhibe expresión de marcadores de lesiones endometriósicas que se observan *in vivo*, por lo que puede utilizarse para caracterizar e identificar genes y/o marcadores relacionados con la EDT. Su tiempo de duplicación es de 31h y fue cultivada en DMEM conteniendo 10% de SFB, 1% de glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina (medio completo 2) en una atmósfera humidificada de 7,5% de CO₂ a 37°C, hasta una confluencia del 70-80% (aproximadamente), momento en el cual se sub-cultivaron o se sembraron para ser utilizados en los experimentos correspondientes.

Línea de células de estroma endometrial humano inmortalizadas con telomerasa

T-HESCs (ATCC CRL-4003):

Esta línea de células de estroma endometrial humano (Human Endometrial Stromal Cells) es una línea celular no tumoral tipo fibroblástica, inmortalizada con telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) ATCC CRL-4003). Fue desarrollada a partir de células de endometrio de una paciente con miomas benignos. En ellas se observó una respuesta clásica de decidualización al estímulo con estradiol y acetato de medroxiprogesterona, y que la progesterona induce o regula la expresión de la proteína de unión del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), la fibronectina, la prolactina, el factor tisular y de Fas/FasL. El tiempo de duplicación es de 30-34 h. Dado que estas células conservan el cariotipo, la morfología y el fenotipo de las células de las que derivaron, es que se las considera un recurso poderoso y consistente para el trabajo *in vitro*. (Krikun et al., 2004).

Las células T-HESC se mantuvieron en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories) y los antibióticos estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml (Sigma) (medio completo 3). Las células se cultivaron en frascos de 25 o 75 cm³ y se incubaron bajo condiciones de esterilidad en estufa a 37°C con 5% CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente 70-80%, momento en el cual se subcultivaron y se utilizaron para los experimentos detallados más adelante.

Línea de células de estroma endometrial humano inmortalizadas por telomerasa

St-T1b:

La línea celular del estroma endometrial humano inmortalizado (St-T1b), fue inicialmente aislada del tejido endometrial proliferativo normal durante la laparoscopia diagnóstica. Fueron inmortalizadas y caracterizadas por su funcionalidad y comparabilidad con las células estromales endometriales primarias (Brosens et al., 1996; Seidler et al., 2006). Su tiempo de duplicación es de 35h.

Las células St-T1b se cultivaron en una mezcla de $\frac{3}{4}$ (v/v) DMEM (Biowest, Nuailé) y $\frac{1}{4}$ (v/v) MCDB 105® (Biowest, Nuailé), complementadas con 10% (v/v) de SFB a base de carbón, 1X penicilina/estreptomicina (Biowest, Nuailé), 40 µg/ml de gentamicina (Biowest, Nuailé), 5 µg/ml de insulina, 2 mM de L-glutamina (Biowest, Nuailé), 1 mM de aminoácidos no esenciales (Biowest, Nuailé) y 1X de piruvato sódico (Biowest, Nuailé) (medio completo 4); y se mantuvieron en una atmósfera humidificada de 7,5% de CO₂ a 37°C, hasta una confluencia del 70-80% (aproximadamente) momento en el cual se sub-cultivaron o se sembraron para ser utilizados en los experimentos correspondientes.

m.4 Tratamientos

Una vez que se establecieron los cultivos celulares se levantaron las células de las placas de cultivo incubando durante 5 min a 37°C con una solución de tripsina (tripsina 0.25% + ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) (Gibco) en los cultivos celulares realizados en **Buenos Aires**; o bien ACCUTASE™ para aquellos realizados en **Münster**). Se determinó el número de células viables utilizando una solución de azul Tripán al

0.04% en PBS y contando con un hemocitómetro, para posteriormente sembrar la cantidad deseada de células por pocillo en medio completo (según corresponda a cada línea celular). Las mismas se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 70-80% en una estufa gaseada a 37°C, antes de ser estimuladas con los compuestos naturales:

AE: 50 o 100 μM . El compuesto fue reconstituido en hidróxido de Sodio (NaOH) 1M según las indicaciones del fabricante (Sigma Aldrich), y el basal (0 μM) consistió en la concentración final de NaOH utilizada como vehículo (1%).

UA: 20 o 40 μM ; **UB:** 5, 10 o 20 μM . Ambos compuestos fueron reconstituidos en dimetilsulfóxido (DMSO) según las indicaciones del fabricante (Sigma Aldrich), y el basal (0 μM) consistió en la concentración final de DMSO utilizada como vehículo (0.1%).

En todos los casos los estímulos fueron añadidos en medio de cultivo fresco suplementado con 1% SFB.

Las dosis de tratamiento se basaron en datos de la literatura y en experimentos piloto (Tabla i.1).

m.5 Evaluación de la proliferación de células endometriales

Luego de establecer los cultivos celulares, se sembraron entre 20.000 y 50.000 células por pocillo en el caso de cultivos primarios estromales y epiteliales, 5×10^3 células por pocillo en el caso de cultivos de T-HESCs, 2×10^3 células St-T1b por pocillo, 1×10^4 células ECC-1 por pocillo, y 2×10^3 células 12Z por pocillo; en placas plásticas de 96 pocillos

(Corning Inc.) y se incubaron en condiciones basales hasta alcanzar una confluencia del 70%. Luego se lavaron los cultivos con PBS y se agregaron los distintos tratamientos al medio de cultivo fresco.

La viabilidad celular se evaluó luego de 24 y/o 48 h de estímulo mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit de proliferación WST-1 (Roche) para aquellos ensayos realizados en **Buenos Aires**; mientras que en **Münster** se utilizó el kit de proliferación celular de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), tal como se describe en otros trabajos (Seidler et al., 2006). Brevemente se basa en la reducción metabólica del MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenol)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, obteniéndose un compuesto de color azul-violáceo (formazán). Con este fin, se agrega el reactivo en cada pocillo, y se incuba por 2h para luego medir la absorbancia en un espectrofotómetro de placas.

Esta técnica permite determinar en forma indirecta la supervivencia y proliferación celular, dado que la cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se tomaron los valores promedios correspondientes a 4 réplicas por condición experimental. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del basal, media \pm SEM.

m.6 Evaluación del Ciclo Celular de líneas celulares endometriales

Para analizar el efecto del **AE** sobre el progreso del **ciclo celular en las líneas T-HESCs y ECC-1**, se sembraron 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Axygen).

Una vez que alcanzaron el 70-80% de confluencia fueron estimuladas con **AE**: 50 o 100 μM por 24 y 48 h. Al concluir el estímulo las células se levantaron con 0,05% tripsina-EDTA (Gibco), se frenó la reacción con medio de cultivo suplementado con 10% SFB y se centrifugaron las células durante 5 min a 130g. El sedimento conteniendo las células fue lavado con PBS y luego se fijaron en etanol 70% frío agregado lentamente mientras se agitaba el tubo.

Las células se mantuvieron a -20°C hasta el día del análisis por citometría de flujo, momento en el cual se centrifugaron durante 5 min a 130 g, y el pellet resultante se incubó con 3 μl de una solución 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio (Sigma) durante 15 min en oscuridad. Por último se resuspendió en 300 μl de PBS para luego ser evaluadas en el citómetro (FACS Canto II, BD Biosciences). Se tomaron un mínimo de 10.000 eventos para cada condición.

Los resultados se analizaron utilizando el programa informático Cyflogic1.2.1 (Cyflogic). Todos los tratamientos fueron comparados con la condición basal, que fue estimulada con el vehículo (NaOH 1%).

Para analizar el efecto de las urolitinas sobre el progreso del **ciclo celular en las líneas St-T1b y 12Z**, se sembraron las células en placas de cultivo de 6 pocillos y se incubaron hasta obtener un 70% de confluencia en estufa gaseada a 37°C . Luego los cultivos se lavaron con PBS e incubaron con 40 μM **UA** y 20 μM **UB** en medio complementado con 1% de SFB durante 24 h. A continuación, las células se recolectaron, y se diluyeron 100 μL de suspensión celular con 900 μL 4', 6-diamidino-2-phenylindole (CyStain; Partec Münster, Alemania). Se las incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se analizaron mediante citometría de flujo en un CyFlow Space (Partec) utilizando un láser UV de 375 nm para la excitación.

La distribución del ciclo celular se calculó utilizando el software FlowMax (Partec). Todos los tratamientos se compararon con la condición basal, que fue estimulada con el vehículo (DMSO 0,1%).

m.7 Evaluación de la Apoptosis en líneas celulares endometriales

Se evaluó la **apoptosis** de células tratadas por 24 h con las urolitinas, mediante citometría de flujo. Las células **St-T1b** y **12Z** fueron tratadas con 40 μ M **UA** o 20 μ M **UB** por 24 h.

Las células apoptóticas se detectaron según su capacidad de unirse a la anexina V (kit de detección de apoptosis FITC, BD Pharmingen, Heidelberg) como resultado de las inversiones de las moléculas de superficie de la membrana relacionadas con la apoptosis y se tiñeron con yoduro de propidio (IP) para identificar las células apoptóticas tardías. La emisión de fluorescencia se midió a 527 y 675 nm en un citómetro de flujo (CyFlow Space, Partec, Münster, Alemania).

El ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en trabajos previos donde se detalla la tinción y medición (Greve et al., 2009).

m.8 Ensayo de adhesión de células T-HESCs y ECC-1 en presencia de medios condicionados de explantos de tejido endometrial.

Previo consentimiento informado, durante las laparoscopías, se tomaron muestras de tejido endometrial ectópico y eutópico en pacientes con EDT, así como muestras de tejido eutópico en mujeres controles. Dentro de las 12 h de tomada la muestra se

prosiguió con su procesamiento en el laboratorio. Se pesó la biopsia en una balanza de precisión y se la cortó con la ayuda de un bisturí estéril en trozos. Dichos fragmentos, se incubaron en estufa gaseada a 37°C con 2 ml de medio MEM-DVAL sin suplementar. El control de adhesión consistió en un pocillo con 2 ml de medio sin explantes de tejido, incubado en las mismas condiciones. Transcurridas las 24 h de incubación se retiró el medio condicionado (MC) de la placa, se centrifugó a 1500 rpm y se conservó el sobrenadante a -20°C hasta el momento del ensayo de adhesión.

Código de la muestra	Edad de la paciente al momento de tomar la muestra	Manifestaciones de la enfermedad	Localización de la muestra
1A / 1B	Sin datos	EDT superficial ovárica estadio I. Sin esterilidad.	A: Endometrio eutópico B: quiste en ovario izquierdo
2A / 2B	Sin datos	EDT peritoneal estadio II Esterilidad.	A: Endometrio eutópico B: lesión peritoneal
3A	44	EDT ovárica estadio III. Sin esterilidad.	Endometrio eutópico
4A	45	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
5A / 5B	44	EDT superficial ovárica estadio I. Sin esterilidad.	A: Endometrio eutópico B: quiste en ovario izquierdo
6A / 6B	39	EDT estadio IV Esterilidad.	A: Endometrio eutópico B: lesión vesico-uterina
7A	35	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
8A	20	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
9A / 9B	38	EDT mínima Esterilidad	A: Endometrio eutópico B: lesión saco de Douglas
10A / 10B	Sin datos	EDT ovárica estadio IV	A: Endometrio eutópico B: quiste en ovario derecho
11A	41	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
12A	43	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
13A	40	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
14A	28	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
15A	32	Paciente control. Sin esterilidad	Endometrio eutópico
16A / 16B	20	EDT peritoneal estadio I Sin esterilidad	A: Endometrio eutópico B: lesión peritoneal

Tabla m.3: Características de las biopsias endometriales para Medios Condicionados (Buenos Aires). Muestras utilizadas para MC de explantes de tejido endometrial.

A continuación se pre-incubaron las placas de 96 pocillos con MC de explantes de tejido endometrial o MC control Over Night (ON). Posteriormente se descartó el MC, se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) 1mg/ml por 60 min, y una vez transcurrido ese tiempo se sembraron aproximadamente 15.000 células por pocillo en su correspondiente medio de cultivo. Luego de 60 min se lavaron los pocillos para eliminar aquellas células no adheridas, y se procedió a evaluar la viabilidad de las células adheridas mediante el agregado de MTS y su posterior lectura en un espectrofotómetro de placas (Labsystem Multiscan).

En este análisis se evaluó la capacidad de adherirse de células **T-HESCs** y **ECC-1**, en presencia de MC provenientes de muestras de tejido endometrial ectópico y eutópico provenientes de 7 pacientes con EDT, y muestras de tejido eutópico de 8 mujeres controles.

Los resultados se expresaron como porcentaje de células adheridas respecto del basal (adhesión en presencia de MC control). Protocolo modificado de (Sacca et al., 2012)

m.9 Ensayo de adhesión en presencia de AE, UA o UB

Se evaluó la **adhesión celular** mediante un ensayo de adhesión a placa de cultivo por parte de las células previamente tratadas por 24h con los compuestos. Las células **T-HESCs** y **ECC-1** fueron tratadas con **AE** 50 o 100 μ M, mientras que **St-T1b** y **12Z** fueron tratadas con **UA** 20 y 40 μ M o **UB** 5 y 10 μ M.

Brevemente, las células fueron cultivadas en su respectivo medio de cultivo en estufa gaseada a 37° hasta alcanzar una confluencia del 70%. Luego, fueron tratadas durante 24 h adicionales con vehículo o los diferentes tratamientos en medio de cultivo

suplementado con 1% suero. A continuación, las células fueron recolectadas, resuspendidas en un medio libre de suero y se dejaron recuperar durante 40 min. Tras la recuperación, la suspensión celular se sembró en una nueva placa de cultivo. En el caso de los ensayos con **T-HESCs** y **ECC-1** realizados en **Buenos Aires**, se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas de 12 pocillos; mientras que para las líneas **St-T1b** y **12z** realizados en **Münster** se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Se cultivaron en una estufa gaseada a 37°C durante 60 min. Después de eso, los pocillos fueron lavados cuatro veces con PBS, y las células adheridas fueron recolectadas y contadas.

Se determinó la adhesión celular tiñendo las células con azul de tripán 0.04% en PBS y contándolas con un hemocitómetro bajo un microscopio de contraste de fase. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y sus promedios se compararon con la condición basal (células estimuladas con vehículo).

Protocolo modificado de (Ferreira et al., 2013; Lee et al., 2013; Nakahata et al., 2006)

m.10 Ensayo de migración en presencia de AE, UA o UB

El ensayo de cicatrización se realizó utilizando un procedimiento previamente establecido en otros trabajos de investigación (Götte et al., 2008).

Brevemente, las células se sembraron en una placa de cultivo y se dejaron crecer hasta generar una monocapa. Utilizando la punta de un tip para micropipeta de 100 μ L, se realizó una herida en cruz y las células desprendidas fueron eliminadas mediante un lavado con PBS. Inmediatamente después se añadió el estímulo: en el caso de las células **T-HESCs** y **ECC-1** se agregó **AE** 50 o 100 μ M; mientras que las células **St-T1b** y **12Z**

recibieron 40 μM de **UA** o 20 μM de **UB**. En todos los casos el estímulo se adicionó en el medio adecuado para cada tipo celular complementado con 1% suero. El control de migración consistió en células estimuladas con vehículo en medio de cultivo complementado con 1% suero.

El cierre de la herida por *scratch* fue monitoreado con el microscopio de luz de contraste y documentado con una cámara. Las imágenes se obtuvieron inmediatamente después de la herida (0 h) para definir la condición inicial, y a diferentes tiempos posteriores; teniendo en cuenta los tiempos de duplicación de cada línea celular a evaluar, de forma tal de no confundir células migrantes con células nuevas.

Se utilizó el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) para calcular el área de la herida libre de células. La tasa de cicatrización para los diferentes tiempos se calculó utilizando el método de análisis de la relación de cierre, el cual normaliza las áreas de heridas a distintos tiempos con respecto al área de la herida en el tiempo 0 h (Chen et al., 2013):

$$\text{Tasa de cicatrización a tiempo } X (\%) = \left[\frac{(\text{área de herida a las } 0 \text{ h} - \text{área de herida a las } X \text{ h})}{\text{área de herida a las } 0 \text{ h}} \right] * 100$$

Se compararon las tasas de cicatrización a los distintos tiempos para cada tratamiento respecto a la tasa de cicatrización del vehículo (basal).

m.11 Ensayo de invasión en presencia de UA o UB

2.5 x 10⁴ células epiteliales **12Z** en 500 μl de medio de cultivo suplementado con 1% SFB y la concentración correspondiente de **UA** o **UB** fueron sembradas por duplicado en los compartimentos superiores de las BioCoat Matrigel Invasion Chambers (BD

Biosciences, Heidelberg, Germany). En el compartimento inferior se cargaron 750µl de medio de cultivo suplementado con 1% SFB libre de estímulo. El sistema de invasión se incubó 24 h en estufa gaseada, las células retenidas en la superficie inferior de la membrana de matrigel fueron fijadas, teñidas con Diff-Quik dye (Medion, Düdingen, Suiza) y fotografiadas con un microscopio Zeiss Axiovert equipado con el software Axiovision (Zeiss, Jena, Alemania) con un aumento de x50.

Para cada membrana, se contaron las células de dos campos visuales. En las 3 repeticiones del experimento, cada condición de tratamiento se llevó a cabo por duplicado. Los resultados se expresaron como el número de células retenidas en las membranas de matrigel.

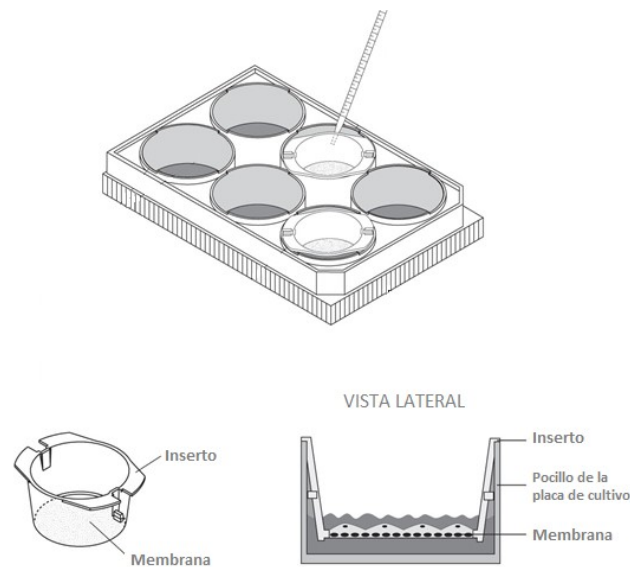


Figura m.1: Sistema de Invasión por inserto BioCoat Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences). Modificado de “Enhancing Cell Culture and Accelerating Discovery. BD Biosciences - Webinar Series”.

m.12 Análisis cuantitativo TaqMan de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) luego del tratamiento con UA y UB

La extracción de ARN se realizó utilizando el innuPREP RNA Mini Kit (Biometra, Göttingen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN fue controlada mediante espectrofotómetro calculando la relación de absorbancia a 260 nm/220 nm.

La transcripción inversa de ARNm se realizó utilizando el **First Strand cDNA Synthesis Kit** (Fermentas/Fisher Scientific, Schwerte, Alemania), utilizando primers hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa M-MuLV.

El ADN complementario correspondiente a 0,5 ng de ARN total se utilizó como templado en el análisis de PCR.

La mezcla de reacción consistió en **ABIMaster Mix** y los siguientes sistemas de expresión génica TaqMan (ABI) prediseñados.

Gen	Abreviatura	Código
rRNA humano 18S (gen housekeeping)	18S	(Hs9999999901_s1)
Metaloproteasa 2	MMP2	(Hs00234422_m1)
Metaloproteasa 3	MMP3	(Hs00968305_m1)
Metaloproteasa 9	MMP9	(Hs00234579_m1)
Inhibidor tisular de la metaloproteasa tipo 1	TIMP1	(Hs00171558_m1)
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1	(Hs01902432_s1)
Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2	ROCK2	(Hs00153074_m1)
Syndecan 1	SDC1	(Hs00174579_m1)
Integrina Alfa V	ITGAV	(Hs00233808_m1)

Tabla m.4: Sistemas de expresión génica TaqMan (ABI). Detalles sobre las regiones target de estos sistemas de amplificación pueden ser encontrados en la página Web de ABI (www.allgenes.com).

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en placas de 96 pocillos utilizando el **Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7300** utilizando las condiciones de ciclo térmico predeterminadas (desnaturalización 10 min a 95°C [1×], seguida de 40 ciclos de desnaturalización [15 segundos a 95°C] y reconocimiento y extensión combinados [60 segundos a 60°C]).

Para la cuantificación relativa se utilizó el método del Umbral del ciclo (Ct) comparativo $2(-\Delta\Delta Ct)$, el cual expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del gen *housekeeping*, en este caso 18S rRNA.

Experimentos *In vivo*.**m.13 Animales**

Se utilizaron ratones hembra vírgenes BALB/c de 2 meses de edad del bioterio del Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, los que fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental con alimento y agua *ad libitum*, bajo un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad constante.

Todos los procedimientos se hicieron bajo las Normas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH) de los Estados Unidos, y fueron aprobados tanto por el **Comité de Ética y la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IBYME** (CE 025-2/2012 y CICUAL: 031/2016, respectivamente) como por la **Oficina de Bienestar Animal de Laboratorio** (Office of Laboratory Animal Welfare - Assurance ID: F16-00065 (A5072-01)-).

m.14 Cirugía

Todos los animales fueron intervenidos quirúrgicamente. En el caso de los animales del grupo con EDT, se les indujeron lesiones de tipo endometriósicas mediante el trasplante autólogo de fragmentos de uno de los cuernos uterinos al mesenterio del intestino como se ha descrito previamente (Bilotas et al., 2010); mientras que a los

pertenecientes al grupo Sham se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico con la diferencia de que no se indujeron las lesiones endometriósicas. Brevemente, los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina (120mg/kg peso) / xilacina (10mg/kg peso) y se les realizó una incisión medioventral para exponer el útero y los intestinos. Se extirpó uno de los cuernos uterinos y se colocó en medio estéril DMEM-F12 (Gibco). En los grupos en los que se indujo la enfermedad, se abrió el cuerno uterino extraído longitudinalmente y se lo cortó en fragmentos de aproximadamente 4mm². Tres fragmentos fueron suturados al mesenterio del intestino con un único punto de sutura utilizando hilo no reabsorbible (Supralon, Ethicon) y se cerró el abdomen. El fragmento de cuerno uterino extraído de las ratonas del grupo Sham se descartó, y se procedió a cerrar el abdomen, con el fin de generar el mismo ambiente inflamatorio propio de la cirugía que se genera en el grupo con EDT.

Este modelo animal ha sido aceptado como modelo experimental para el estudio de la EDT en numerosos trabajos publicados (Olivares et al., 2011; Ricci et al., 2013; Ricci et al., 2011).

m.15 Diseño experimental

Los animales se distribuyeron al azar en los distintos grupos experimentales. Los tratamientos se iniciaron a las 2 semanas post-cirugía y se continuó por 4 semanas. Los ratones fueron monitoreados diariamente y no se encontraron evidencias de toxicidad a las dosis de tratamiento administradas basándonos en el peso corporal, el consumo de comida, el comportamiento y el nivel de actividad comparados con los animales Sham.

Tratamientos naturales

- Experimento con AE

34 animales fueron asignados al azar en 5 grupos experimentales: AE 30 (30mg/kg peso en agua), AE 60 (60mg/kg peso en agua), AE 100 (100mg/kg peso en agua), Control (agua de bebida) y Sham (agua de bebida). El tratamiento con AE (Sigma Aldrich) fue administrado como una suspensión en agua de bebida por vía oral, con ayuda de una sonda esofágica, diariamente por 4 semanas.

- Experimento con UA y UB

Las urolitinas (Santa Cruz) se disolvieron en DMSO para alcanzar un stock de 50mg/ml para UA y 10mg/ml para UB, según las indicaciones del fabricante. 33 animales fueron asignados al azar en 4 grupos experimentales: UA (2,5 mg/kg peso/día), UB (2,5 mg/kg peso/día), Control (DMSO 1%) y Sham (DMSO 1%). El tratamiento consistió en inyecciones intraperitoneales diarias por 4 semanas.

m.16 Evaluación del ciclo estral

Todos los grupos fueron ciclados una vez al día por el método de citología vaginal, durante las últimas 2 semanas de tratamiento, para evaluar el efecto de estas terapéuticas sobre el ciclo estral. Para ello las muestras vaginales se recolectaron entre las 8 y las 9 am mediante un lavaje con 40µl de solución fisiológica a temperatura ambiente, y se realizó un frotis. Posteriormente, se determinó la fase del ciclo estral analizando la proporción de células epiteliales nucleadas, células epiteliales cornificadas y leucocitos, mediante la observación al microscopio óptico.

Esta técnica ha sido utilizada en numerosos trabajos publicados (Byers et al., 2012; Olivares et al., 2011; Ricci et al., 2013; Ricci et al., 2011).

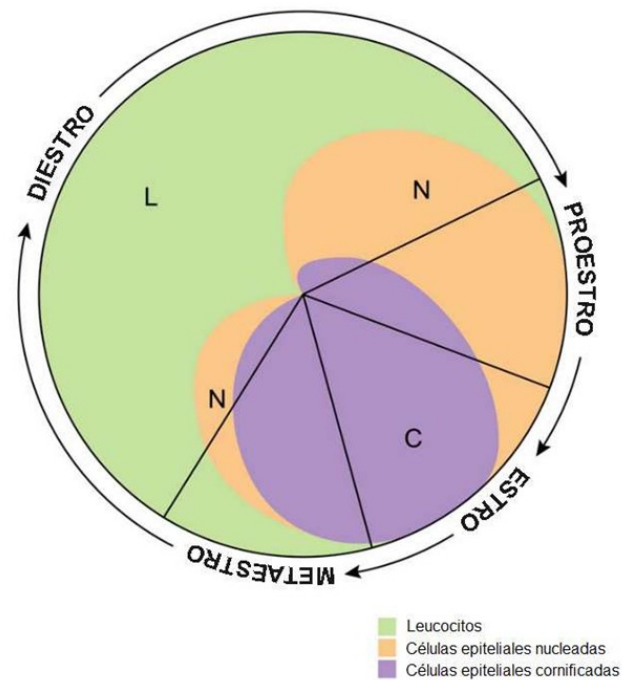


Figura m.2: Identificación del ciclo estral por citología vaginal. El esquema representa la proporción de los diferentes tipos celulares durante las diferentes etapas del ciclo estral, delimitadas entre las líneas del círculo. Modificada de (Byers et al., 2012)

La duración del ciclo estral se determinó utilizando únicamente aquellos que se observaron completos durante el tiempo que se llevó a cabo el ciclado. Por otro lado, en cuanto al número de ciclos observados se contabilizaron tanto los ciclos completos como los incompletos. Por último el número de días transcurridos en cada fase del ciclo estral se calculó en base al total de días de ciclado de cada animal.

m.17 Necropsia y evaluación de tejido ectópico en el modelo murino

Una vez concluidas las 4 semanas de tratamiento, los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina (120mg/kg peso) / xilacina (10mg/kg peso), luego se extrajo sangre mediante punción cardíaca con una aguja de 25G y una jeringa de 1ml; y por último fueron sacrificados por dislocación cervical.

Se abrió la cavidad abdominal, y luego de localizar las lesiones endometriósicas se determinó el volumen de las mismas según la fórmula de $V=4/3.\pi.r^2.R$ (Brodie et al., 2003), a partir de las mediciones con calibre del radio mayor (R) y el menor (r). A continuación las lesiones fueron removidas y fijadas durante 18 h a 4°C en formaldehído al 4% en PBS. Luego se deshidrató el tejido en un gradiente de concentraciones crecientes de alcoholes.

El tejido ectópico fijado se incluyó en parafina, se cortó en secciones de 5µm de espesor. Un mínimo de dos secciones de cada muestra fueron teñidas con hematoxilina-eosina y examinadas histológicamente a fin de confirmar la presencia de tejido endometrial.

m.18 Evaluación de la proliferación celular en el tejido ectópico del modelo murino

La proliferación celular se evaluó por inmunohistoquímica en cortes de lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente, como se indicó en el apartado de **cirugía** (Sección m.14), empleando un anticuerpo policlonal anti-PCNA (antígeno

nuclear de proliferación celular) de ratón obtenido en conejo (Santa Cruz Biotechnology) (Olivares et al., 2011).

El antígeno PCNA es una proteína nuclear de 36 kDa que está asociado con la ADN polimerasa delta, enzima responsable de iniciar la duplicación del ADN. El anti-PCNA reconoce células que se encuentran en las diferentes fases de división del ciclo celular, sin asociarse a las células quiescentes (Ogata et al., 1987).

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 10 min con una solución de H₂O₂ al 3%. La recuperación de antígeno se llevó a cabo con citrato de sodio 10 mM (pH 6) en un horno de microondas a 600 Watts de potencia. A continuación, todos los cortes se bloquearon durante 1 hora a TA con BSA al 4% en PBS, y luego se incubaron durante 90 min a TA con el anticuerpo primario anti-PCNA (1:200 diluido en PBS con 1% de BSA). Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora a TA con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich) diluido 1:200 en PBS seguido de otra incubación durante 30 min a TA con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako) diluido 1:2000 en PBS y se reveló la señal con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako) 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, no se incluyó el respectivo anticuerpo primario en una sección de cada muestra.

Los porta-objetos fueron evaluados al microscopio óptico de campo claro a 400X de magnificación. Las células positivas para PCNA (PCNA+) se identificaron por la presencia

de un precipitado nuclear marrón. La cuantificación de la proliferación celular se realizó contando un mínimo de 300 células de cada tipo (epiteliales o estromales) de al menos cuatro campos representativos de cada corte y se calculó el porcentaje de células PCNA+ por animal, considerando todas las lesiones desarrolladas. Luego los porcentajes se utilizaron para obtener la media de cada grupo experimental.

m.19 Evaluación de apoptosis celular en el tejido ectópico en el modelo murino.

Para la cuantificación de la apoptosis, los cortes de tejido ectópico se sometieron a la técnica TUNEL, utilizando el kit de detección de apoptosis In Situ Cell Death POD (Roche). Los cortes se trataron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como se describió anteriormente en nuestro laboratorio (Bilotas et al., 2015).

Brevemente, las secciones se desparafinaron con xileno, se rehidrataron con etanol en concentraciones decrecientes, se inactivó la actividad de la peroxidasa endógena durante 10 min con una solución de H₂O₂ al 3% y se permeabilizaron por 15 min con 20 µg/ml de Proteínasa K (Gibco) 1/500 en PBS. Luego se incubó 1 hora a 37°C con la enzima TdT y los nucleótidos marcados con fluoresceína. A continuación se bloqueó con BSA 4% y se incubó con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidasa (POD) a 37°C por 30 min, seguido del sustrato de la peroxidasa, DAB. La tinción de contraste se realizó con hematoxilina. Los controles negativos se obtuvieron sometiendo cortes de tejido a un tratamiento idéntico al de las muestras a evaluar pero sin el agregado de la enzima TdT.

Los porta-objetos fueron evaluados al microscopio óptico a 400X de magnificación, se contaron un mínimo de 300 células de cada tipo (estromales o epiteliales) de al menos

cuatro campos representativos de cada corte y se cuantificó el porcentaje de células TUNEL positivas (TUNEL+) sobre el total por animal, considerando todas las lesiones desarrolladas. Luego los porcentajes se utilizaron para obtener la media de cada grupo experimental.

m.20 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad PRISM software 6.0 (GraphPad Software Inc), y se procedió con el siguiente criterio:

Se testeó la normalidad con las pruebas de Shapiro Wilk, D'Agostino y Kolmogorov Smirnov. Si las poblaciones no rechazaban la hipótesis nula de normalidad, se realizaron análisis paramétricos: test "t" de Student para comparar dos subpoblaciones, o ANOVA para comparar tres o más subpoblaciones. Para el caso de ANOVA, se chequeó también la normalidad de los residuos y la homocedácea (homogeneidad de varianzas). Si no se rechazaban las hipótesis nulas, en caso de detectar diferencias significativas en el ANOVA, se procedió con un método de contrastes de Tukey.

Si en la prueba de normalidad las subpoblaciones rechazaban la hipótesis nula, se procedió con pruebas no paramétricas. Las pruebas equivalentes al test "t" de Student fue la prueba de Mann Whitney para variables discretas ordinarias; y la equivalente al ANOVA fue la prueba de Kurskall Wallis, con el posterior contraste de Dunn.

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar (SEM). Como criterio general para todos los análisis se consideraron estadísticamente significativos únicamente aquellos valores cuyo $p < 0,05$.

Capítulo 1

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÁCIDO ELÁGICO SOBRE EL DESARROLLO DE TEJIDO ENDOMETRIAL.

1.1 Introducción

La búsqueda de tratamientos novedosos para la EDT capaz de subsanar las desventajas y limitaciones de la terapéutica actual, que resulten más accesibles, que minimicen los efectos secundarios y permitan el embarazo; nos condujo al estudio de los efectos de compuestos naturales sobre esta enfermedad.

Teniendo en cuenta el aumento en el consumo de frutos rojos en los últimos años (Sobekova et al., 2013), y los diversos efectos que el AE ejerce sobre diferentes tipos de células (Mele et al., 2016; Park et al., 2011; Ríos et al., 2018), consideramos que este compuesto podría ser una buena opción como terapia alternativa para la EDT.

Por lo tanto, en este capítulo, investigamos las propiedades del AE en modelos *in vitro* e *in vivo* analizando sus efectos sobre los parámetros que presentan las alteraciones más relevantes en pacientes con EDT.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del AE, *in vitro*, sobre la supervivencia de células endometriales epiteliales y estromales.

- Estudiar el efecto del AE, *in vitro*, sobre el comportamiento de líneas celulares endometriales epiteliales (ECC-1) y estromales (T-HESCs).
- Evaluar el efecto del AE, *in vivo*, sobre el desarrollo de la EDT en un modelo experimental en ratonas BALB/c.

1.3 Resultados

1.3.1 *In vitro*

Efecto del AE, *in vitro*, sobre la supervivencia de células epiteliales y estromales de endometrio.

Para comenzar con la investigación de los posibles efectos terapéuticos del AE sobre el desarrollo de la EDT, decidimos estudiar su acción *in vitro* sobre la supervivencia y el crecimiento de células endometriales humanas. Para ello se utilizaron tanto cultivos primarios epiteliales y estromales provenientes de biopsias de endometrio eutópico de pacientes con EDT y control, como cultivos de la línea celular estromal T-HESCs y la línea celular epitelial ECC-1; a fin de obtener una mejor caracterización del efecto del compuesto sobre la enfermedad.

Evaluación de la proliferación de células epiteliales y estromales de tejido endometrial.

Los diferentes cultivos fueron tratados con dos concentraciones de AE (50 y 100 μ M) por 24 o 48 h. Posteriormente se calcularon los porcentajes de proliferación respecto al basal (incubado con vehículo).

Los resultados demuestran que ninguna de las concentraciones ensayadas del compuesto posee un efecto estadísticamente significativo sobre la proliferación celular en células endometriales humanas (epiteliales o estromales) provenientes de pacientes (Figura 1.1 A y B, respectivamente). Es importante destacar que, tal como ha sido descrito en trabajos anteriores, no se hallaron diferencias significativas en los resultados de los parámetros evaluados entre los cultivos celulares primarios provenientes del grupo control y del grupo EDT (Olivares et al., 2008). Esto demuestra que el diagnóstico de las pacientes de quienes se obtuvieron las biopsias no influyó en los efectos observados durante el ensayo lo cual atribuimos a la manipulación y aislamiento de las células.

De igual manera, no observamos efectos estadísticamente significativos en la proliferación celular de cultivos de ECC-1 o T-HESCs luego del tratamiento con ambas dosis del compuesto (Figura 1.1 C y D, respectivamente).

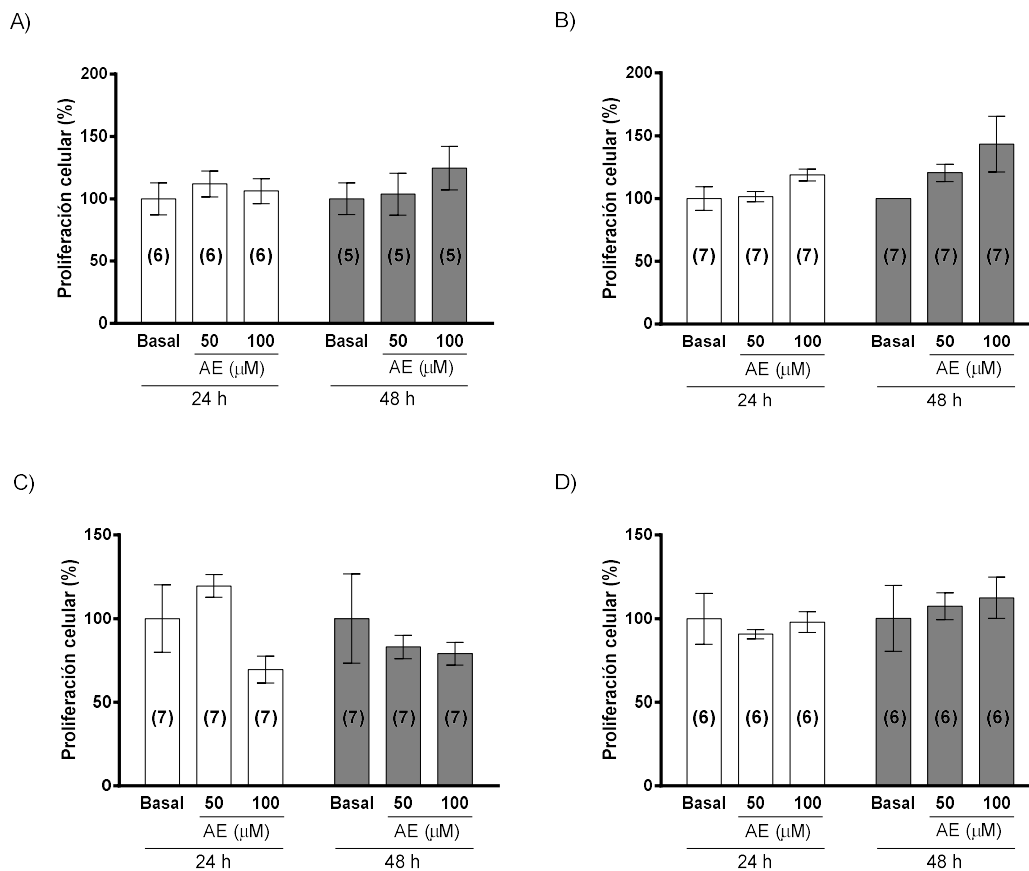


Figura 1.1: Efecto del AE sobre la proliferación de células endometriales. Los cultivos celulares primarios epiteliales (A) y estromales (B) de pacientes con EDT y controles; y las células ECC-1 (C) y T-HESCs (D); se trataron con AE 50 y 100 μM o vehículo (grupo basal) durante 24 h (barras blancas) o 48 h (barras grises). La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo WST. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del basal, media ± SEM. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

Las dosis de AE evaluadas no ejercen efectos antiproliferativos sobre los cultivos de células endometriales epiteliales y estromales humanas.

En cuanto a los modelos disponibles para el estudio de la EDT, es importante aclarar que el trabajo *in vitro* con células endometriales humanas primarias es sumamente complicado. Si bien idealmente correspondería llevar a cabo los ensayos en cultivos primarios, la limitada disponibilidad de tejido, las dificultades para el establecimiento del cultivo y la corta vida útil de estas células en los subsecuentes pasajes, hacen que los estudios sean difíciles de emprender y reproducir. De aquí que la utilización de líneas celulares obtenidas a partir de células humanas inmortalizadas, facilita enormemente las investigaciones en patologías como la estudiada en la presente tesis (Krikun et al., 2004). Teniendo esto en cuenta, y dado que tanto las líneas celulares como los cultivos primarios se comportaron de manera similar en el ensayo de proliferación y frente a la complejidad que confiere el manejo y establecimiento de cultivos primarios; a partir de este punto se continuó con la investigación utilizando las líneas celulares **ECC-1** y **T-HESC** como modelo experimental *in vitro* representativo.

Evaluación del ciclo celular de células endometriales epiteliales y estromales.

Para tener una perspectiva más completa, a continuación evaluamos la capacidad del AE de intervenir en el progreso del ciclo celular. Para ello los perfiles de distribución de las células en las diferentes fases del ciclo fueron analizados mediante citometría de flujo luego de 24 o 48 h de tratamiento.

Los efectos de ambas concentraciones de AE (50 y 100 μM) sobre la progresión del ciclo celular se muestran en la Figura 1.2, donde se grafica el porcentaje de células en cada estadio.

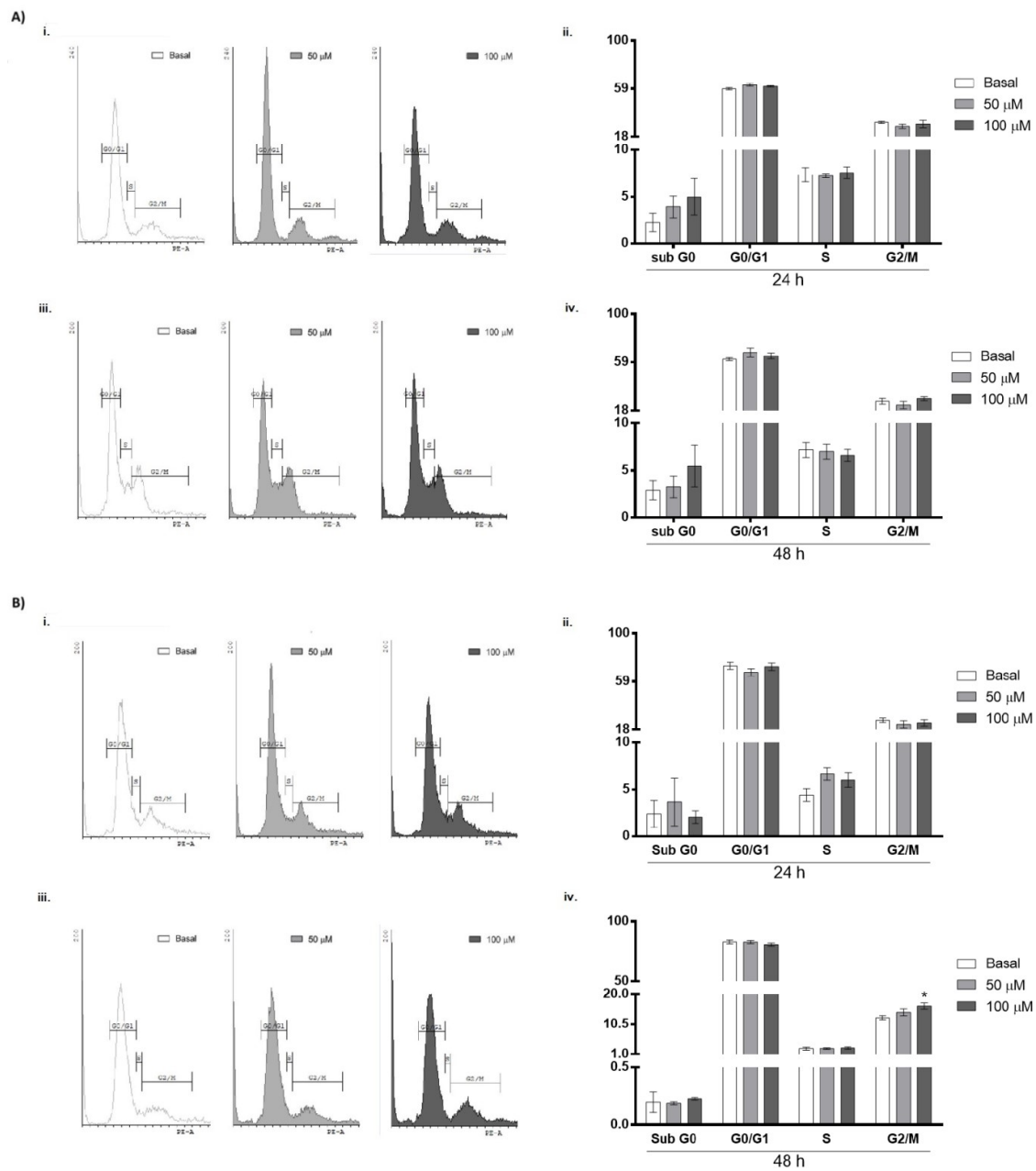


Figura 1.2: Efecto del AE sobre la progresión del ciclo celular en cultivos de células endometriales.

Luego de la marcación del ADN con yoduro de propidio, se evaluó el ciclo celular por citometría de flujo en células ECC-1 (A) y T-HESCs (B) tratadas con AE 50 y 100 μ M o vehículo (grupo basal) durante 24 o 48 h. (i) (iii) Histogramas representativos a un ensayo para cada tratamiento por 24 y 48 h respectivamente. Se muestra la delimitación de las fases del ciclo. (ii)(iv) Porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular luego del tratamiento por 24 y 48 h respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del basal, media \pm SEM. * $p < 0,05$. El número de réplicas $N = 5$.

Como se puede observar, el tratamiento con 100 μ M AE durante 48 h fue el único capaz de provocar un arresto significativo del ciclo celular en la fase G2/M exclusivamente en células T-HESC (Figura 1.2 B inferior; $p < 0,05$); mientras que no se evidenciaron diferencias significativas en las demás condiciones.

Cabe destacar que en la cuantificación de los resultados se agregó al análisis la fase sub G0, ya que la misma suele utilizarse como una primera aproximación al reconocimiento de células apoptóticas. Esto se debe a que las endonucleasas activadas durante la apoptosis atacan al ADN y causan una extensa fragmentación del mismo (Pozarowski et al., 2004). Estas células apoptóticas a menudo acaban con un contenido deficiente de ADN, y pueden ser reconocidas por citometría como células que tienen menor contenido de ADN respecto de las células en la fase G0/G1 por lo que en los histogramas forman un pico característico sub-G0/G1 (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004). En nuestro caso, el porcentaje de células en dicho estadio no presentó diferencias significativas respecto del basal, sugiriendo la ausencia de efecto proapoptótico por parte del AE sobre las células endometriales.

El tratamiento por 48 h con 100 μ M de AE induce el arresto de las células T-HESCs en el estadio G2/M del ciclo celular.

Efecto del AE, *in vitro*, sobre el comportamiento de células endometriales epiteliales y estromales.

Como corolario de la teoría de la implantación propuesta por Sampson, se desprende que la probabilidad de desarrollar la enfermedad está influenciada por diversas alteraciones que favorecen los procesos de implantación y crecimiento celular en sitios ectópicos. Durante este proceso las células endometriales que llegan a la cavidad peritoneal muestran comportamientos particulares y diferentes a los de las células endometriales normales, lo que les permite adherirse e invadir la estructura del peritoneo o de órganos pélvicos como el ovario.

Como se demostró en trabajos previos, aunque el endometrio de mujeres sanas y mujeres con EDT resultan estructuralmente similares, existen diferencias bioquímicas y moleculares entre ellas (Ulukus et al., 2006). Estas diferencias podrían explicar la mayor capacidad de adhesión e invasión de las células endometriales de mujeres con EDT, lo que favorece la formación de lesiones endometriósicas (Bałkowiec et al., 2018). Por ejemplo, se reportó que la expresión de integrinas, una familia de receptores conocidas por mediar la adhesión de las células a las células vecinas o a la matriz extracelular (Sillem et al., 1999), se encuentra alterada en el endometrio de mujeres con EDT (Lessey et al., 1994). Asimismo, se informó que la presencia de células endometriales en la cavidad peritoneal induce modificaciones en ese microambiente en un modelo murino de la EDT (Cao et al., 2004). Por último, el endometrio de mujeres que padecen EDT presenta una mayor actividad proteolítica (Collette et al., 2004), lo cual representa una de las estrategias para que las células logren invadir tejidos adyacentes y además migrar a distancia a través de la circulación.

Efecto del microambiente del tejido endometrial de pacientes con EDT sobre la adhesión celular.

Con el objetivo de confirmar las diferencias entre los microambientes peritoneales de pacientes con EDT respecto de pacientes control, estudiamos la influencia del medio condicionado (MC) obtenido a partir del tejido endometrial sobre la adhesión de las líneas celulares ECC-1 y T-HESCs (Figura 1.3).

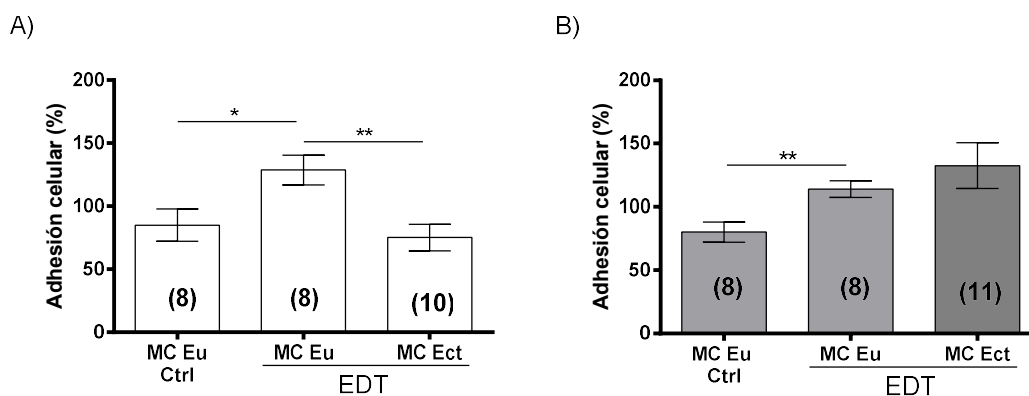


Figura 1.3: Efecto del tejido endometrial sobre la adhesión de células endometriales. Luego de cultivar por 24 h explantos de tejido provenientes de mujeres controles y de pacientes con EDT, se obtuvieron los medios (MC). Se evaluó el efecto de MC de pacientes control o MC de pacientes con EDT sobre la adhesión celular en cultivos celulares de ECC-1 (A) y T-HESCs (B), y se calculó el porcentaje de células adheridas totales respecto a la condición inicial. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. El número de réplicas (número de pacientes) se expresa entre paréntesis en cada barra.

Coincidentemente con los antecedentes bibliográficos (Kyama et al., 2006; Lessey et al., 1994; Ricci, 2012; Sillem et al., 1999) y como se puede observar en la Figura 1.3, la adhesión de ambos tipos celulares es significativamente mayor en presencia de MC

obtenidos de explantos de tejido eutópico de pacientes con EDT, en comparación con lo observado en presencia de MC de las pacientes control.

En un análisis posterior, al comparar las diferentes procedencias de los MC entre las pacientes con EDT, observamos que en el caso de las células ECC-1 la presencia de MC de tejido eutópico induce una mayor adhesión celular respecto del proveniente de tejido ectópico. Sin embargo, esta misma comparación no mostró diferencias significativas en cultivos de T-HESCs; sugiriendo que dicha diferencia no puede generalizarse.

El MC obtenido de tejido endometrial de pacientes con EDT, posee capacidad estimuladora de la adhesión de las células ECC-1 y T-HESCs.

Efecto del AE sobre la adhesión celular.

No obstante, aún es poco claro cómo el epitelio o el estroma endometrial se adhieren al sitio ectópico (Witz et al., 1999). Teniendo en cuenta que la adhesión de estas células es crucial en el desarrollo de las lesiones endometriósicas, nos propusimos analizar y comparar el efecto directo del AE sobre la adhesión celular. Para ello se pre-trataron cultivos celulares de ECC-1 y T-HESC por 24 h con soluciones 50 o 100 μ M del compuesto; y posteriormente se evaluó su capacidad de adherirse a placas de cultivo en comparación con la adhesión de células pre-tratadas con vehículo (Figura 1.4).

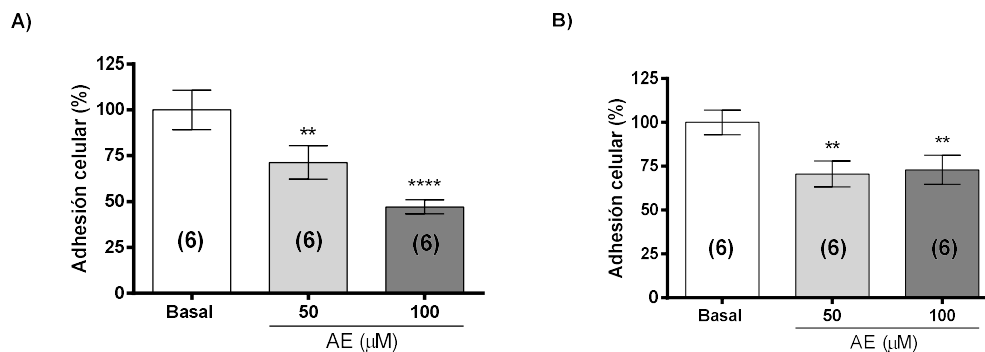


Figura 1.4: Efecto del AE sobre la adhesión celular. Los cultivos celulares de ECC-1 (A) y T-HESCs (B), se trataron con AE 50 y 100 μM o vehículo (grupo basal) durante 24 h y posteriormente se evaluó su adhesión mediante el ensayo de adhesión a plástico. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas totales respecto a la condición inicial, media \pm SEM. ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.001$. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

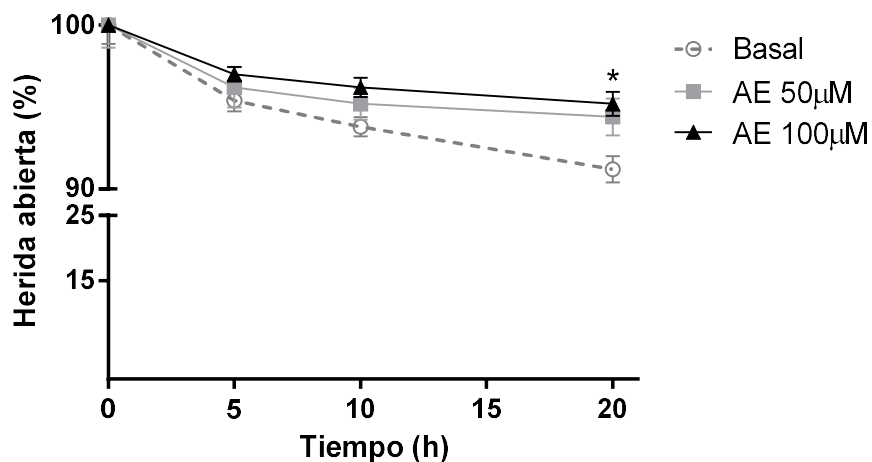
Como se muestra en la Figura 1.4, la capacidad de adhesión de las células pre-tratadas con 50 y 100 μM de AE se redujo significativamente tanto en ECC-1 ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ vs. Basal respectivamente), como en T-HESC ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ vs. Basal respectivamente).

El pre-tratamiento por 24 h con AE 50 y 100 μM , reduce significativamente la capacidad de adhesión de células ECC-1 y T-HESCs.

Efecto del AE, *in vitro*, sobre la migración de células endometriales humanas.

Una vez evidenciado el efecto del compuesto sobre la adhesión celular, el siguiente paso fue evaluar su acción sobre la actividad proteolítica de las células endometriales a través de ensayos de migración celular en ECC-1 y T-HESCs.

A)



B)

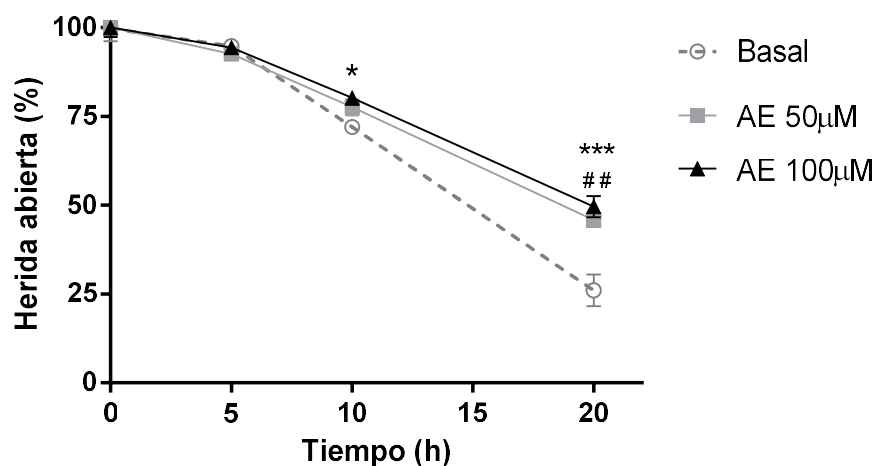


Figura 1.5: Efecto del AE sobre la migración celular. Los cultivos celulares de ECC-1 (A) y T-HESCs (B), se trataron con AE 50 y 100 µM o vehículo (grupo basal) y las imágenes fueron capturadas a las 0, 5, 10 y 20 h posteriores a la generación de la herida. El análisis cuantitativo de la herida se realizó utilizando el software Image J y se expresó como el porcentaje respecto de la superficie a las 0 h para cada tratamiento. Cada punto representa la media de cinco experimentos, realizado por duplicado. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ 100 µM AE respecto del Basal; ## $p < 0.01$ 50 µM AE respecto del Basal

Los resultados expusieron que el tratamiento con 100 μ M AE redujo significativamente la migración de células ECC-1 a las 20 h (Figura 1.5 A; $p < 0,05$), y de células T-HESC a las 10 h y 20 h (Figura 1.5 B; $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente). Además, la dosis 50 μ M de AE causó una disminución significativa en la migración de células T-HESC a las 20 h (Figura 1.5 B; $p < 0,01$); no obstante la misma dosis administrada en células ECC-1 no produjo efectos significativos (Figura 1.5 A).

El tratamiento con AE, reduce significativamente la capacidad migratoria de células ECC-1 y T-HESCs.

1.3.4 *In vivo*

Basados en nuestros hallazgos obtenidos *in vitro*, y con el objetivo de complementarlos, decidimos evaluar el efecto del AE sobre distintos aspectos del desarrollo de la EDT experimental en un modelo murino *in vivo*. Para ello, se indujo quirúrgicamente la enfermedad en ratonas BALB/c y posteriormente se los sometió al tratamiento vía oral con tres dosis de AE: 30, 60 y 100 mg/Kg/día.

Efecto del AE, *in vivo*, sobre el ciclo estral.

Durante el ciclo estral ocurren cambios hormonales responsables de la ovulación y del desarrollo de folículos y cuerpos lúteos (Sato et al., 2016). Estos eventos son clave a

la hora de determinar la fertilidad. Dado que el objetivo de esta investigación es la búsqueda de una terapéutica para la EDT que permita la gestación; decidimos en primer lugar evaluar el efecto del AE sobre el ciclo estral en nuestro modelo experimental *in vivo*.

Durante las últimas 2 semanas del experimento, se cicló a todos los animales. Al analizar los resultados, no se observaron diferencias significativas en el número de ciclos ni en la duración de los mismos entre los diferentes grupos (Figura 1.6 A y B, respectivamente).

Al comparar el tiempo transcurrido en cada fase del ciclo estral, nuevamente los resultados demostraron que el tratamiento con AE no generó ninguna diferencia significativa respecto al grupo control, así como tampoco respecto al grupo Sham (Figura 1.6 C).

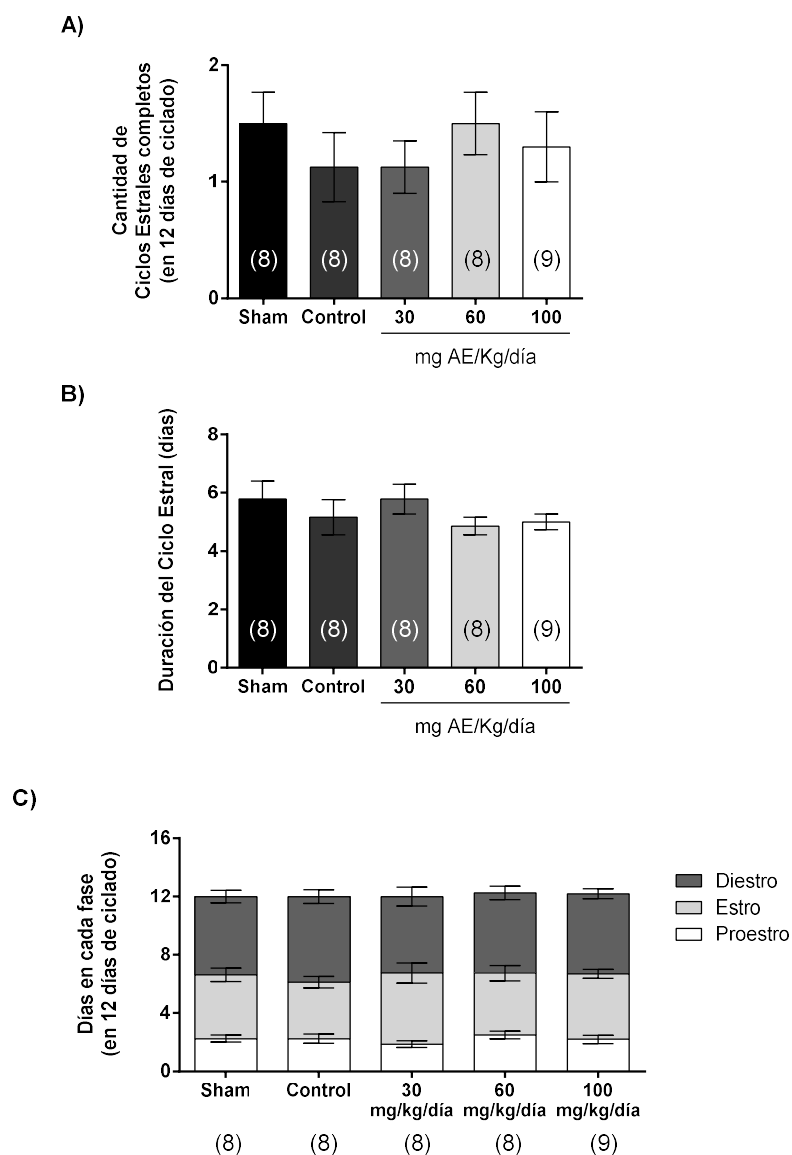


Figura 1.6: Análisis del ciclo estral en el modelo *in vivo* de EDT. Los animales se sometieron a una cirugía de inducción de la EDT. El ciclo estral de ratonas BALB/c Sham, Control y 30, 60, o 100 mg AE/kg/día; fue monitoreado diariamente durante las últimas dos semanas de tratamiento. A) Número de ciclos estrales en 15 días. B) Duración del ciclo estral. C) Tiempo transcurrido en cada fase del ciclo estral. Los resultados se expresan como media \pm SEM. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

El tratamiento con AE, no afecta el normal desarrollo del ciclo estral en el modelo murino de EDT.

Efecto del AE, *in vivo*, sobre el volumen y número de lesiones endometriósicas.

Dado que nuestra intención era evaluar el posible rol terapéutico del AE (y no su eventual rol preventivo), es que el tratamiento comenzó a las 2 semanas de realizada la cirugía de inducción de la EDT a fin de permitir el desarrollo de las lesiones.

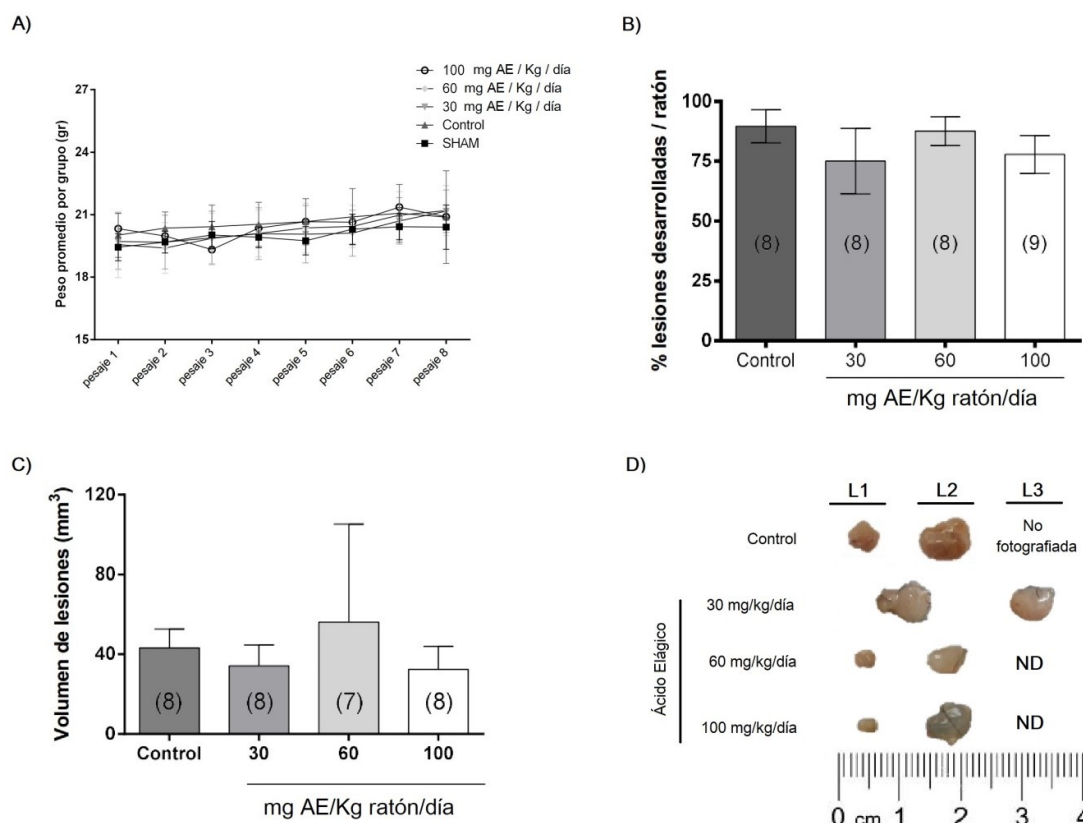


Figura 1.7: Efecto del AE sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas.

Luego de 4 semanas de tratamiento (y 6 desde el momento de la cirugía) los animales fueron sacrificados y se examinó la cavidad peritoneal. (A) Progresión de la media del peso por grupo a lo largo del tratamiento. (B) Porcentaje de lesiones desarrolladas por ratón en cada grupo experimental. (C) Volumen de las lesiones desarrolladas por ratón en cada grupo experimental. (D) Fotografías representativas de las lesiones (L) correspondientes a un animal de cada grupo escogido al azar. Los resultados se expresan como media \pm SEM. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

Los animales fueron monitoreados diariamente y sus pesos individuales fueron tomados cada 3 días. El análisis de estos datos arrojó como conclusión que ni la enfermedad ni el tratamiento generaron modificaciones al comportamiento, los niveles de actividad, el consumo de alimento o el peso corporal de los animales (Figura 1.7 A).

Finalizado el tratamiento de 4 semanas, los animales se sacrificaron y se evaluó el grado de desarrollo de la enfermedad. En una primera instancia se realizó un examen macroscópico de la cavidad peritoneal en el cual se registró la localización y el número de lesiones desarrolladas. Posteriormente, y con ayuda de un calibre, se las midió en sus dos ejes perpendiculares y se calcularon los volúmenes de las mismas.

Los resultados de estas observaciones revelaron que todos los animales, excepto aquellos pertenecientes al grupo Sham, desarrollaron al menos una lesión, confirmando la efectividad de la cirugía.

En cuanto al número de lesiones desarrolladas por ratón, el tratamiento no causó diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (Figura 1.7 B). Cabe destacar que tratándose de un modelo que busca evaluar una terapéutica sobre lesiones desarrolladas, el tratamiento debería causar una involución total de las mismas para poder encontrar una diferencia en este parámetro (Chen et al., 2010; Eggermont et al., 2005). A su vez, el volumen de las lesiones tampoco se ve alterado por el tratamiento (Figura 1.7 C). Como queda expuesto en las fotografías, las morfologías de las lesiones halladas en un mismo animal son muy diversas lo cual influye en la dispersión de los volúmenes promedio por grupo (Figura 1.7 D).

En vista de estos últimos resultados, es que no consideramos necesario realizar técnicas histológicas específicas sobre los tejidos, ya que a nivel macroscópico no se manifestaron diferencias significativas entre los grupos.

*El tratamiento con AE, no afectó significativamente el desarrollo de las lesiones
endometriósicas en ratón.*

Capítulo 2

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS UROLITINAS A y B SOBRE EL DESARROLLO DE LA EDT Y LA REGULACIÓN DE MECANISMOS INVOLUCRADOS.

** Los resultados in vitro del presente capítulo fueron realizados durante una estada corta de investigación en un laboratorio externo.*

Laboratorio: Department of Gynecology and Obstetrics, Münster University Hospital, Albert-Schweitzer-Campus 1, D11, 48149 Münster, Alemania.

Director: Dr. Martin Götte. Fecha: Mayo a Septiembre 2017.

Financiamiento: European Commission Horizon 2020 research and innovation programme MSCA-RISE-2015 project MOMENDO (n° 691058).

2.1 Introducción

Las urolitinas son los metabolitos producidos por la microbiota intestinal a partir de AE presentes principalmente en frutos rojos y frutos secos (Landete, 2011). Como se muestra en la Tabla i.1, son numerosos y variados los efectos atribuidos a estos metabolitos.

Centrándonos en los procesos que son de relevancia etiológica para la EDT, planteamos la hipótesis de que estas urolitinas podrían resultar beneficiosas para el tratamiento de la enfermedad. Por lo tanto, decidimos evaluar específicamente el efecto

de la UA y la UB sobre el crecimiento, la adhesión y la invasión celular en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* establecidos para la investigación de la EDT.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de UA y UB, *in vitro*, sobre la supervivencia de células epiteliales y estromales.
- Estudiar el efecto de UA y UB, *in vitro*, sobre el comportamiento de líneas celulares epiteliales (12Z) y estromales (St-T1b).
- Evaluar el efecto de UA y UB, *in vivo*, sobre el desarrollo de la EDT en un modelo experimental en ratonas BALB/c.

2.3 Resultados

2.3.1 In vitro

Efecto de UA y UB, *in vitro*, sobre la supervivencia de células endometriales epiteliales y estromales.

Comenzamos el estudio de los posibles efectos terapéuticos de las urolitinas A y B con ensayos *in vitro* de **supervivencia** y **crecimiento** de células endometriales humanas. Para ello se utilizaron tanto cultivos primarios estromales provenientes de biopsias de endometrio eutópico de pacientes con EDT, como cultivos de la línea celular estromal St-T1b y la línea celular epitelial endometriósica 12Z; a fin de obtener una mejor caracterización del efecto de los metabolitos sobre el desarrollo de la enfermedad.

Evaluación de la proliferación de células endometriales epiteliales y estromales.

Los cultivos fueron tratados con diferentes concentraciones de UA (20 y 40 μ M) o UB (5, 10 o 20 μ M) por 24 h. Posteriormente se calcularon los porcentajes de proliferación respecto al basal (incubado con vehículo).

Así como fue informado en trabajos previos realizados en otros sistemas experimentales (Adams et al., 2010; Brew & Nagase, 2010; Vicinanza et al., 2013; Yun Wang et al., 2015; Zhang et al., 2016a), las urolitinas afectaron la proliferación celular. En particular, observamos que tanto en cultivos estromales primarios como en células St-T1b, las dosis más altas de ambas urolitinas produjeron una disminución significativa de la proliferación. Sin embargo, en las células 12Z, únicamente la UA produjo el mismo efecto en su dosis de 40 μ M (Figura 2.1).

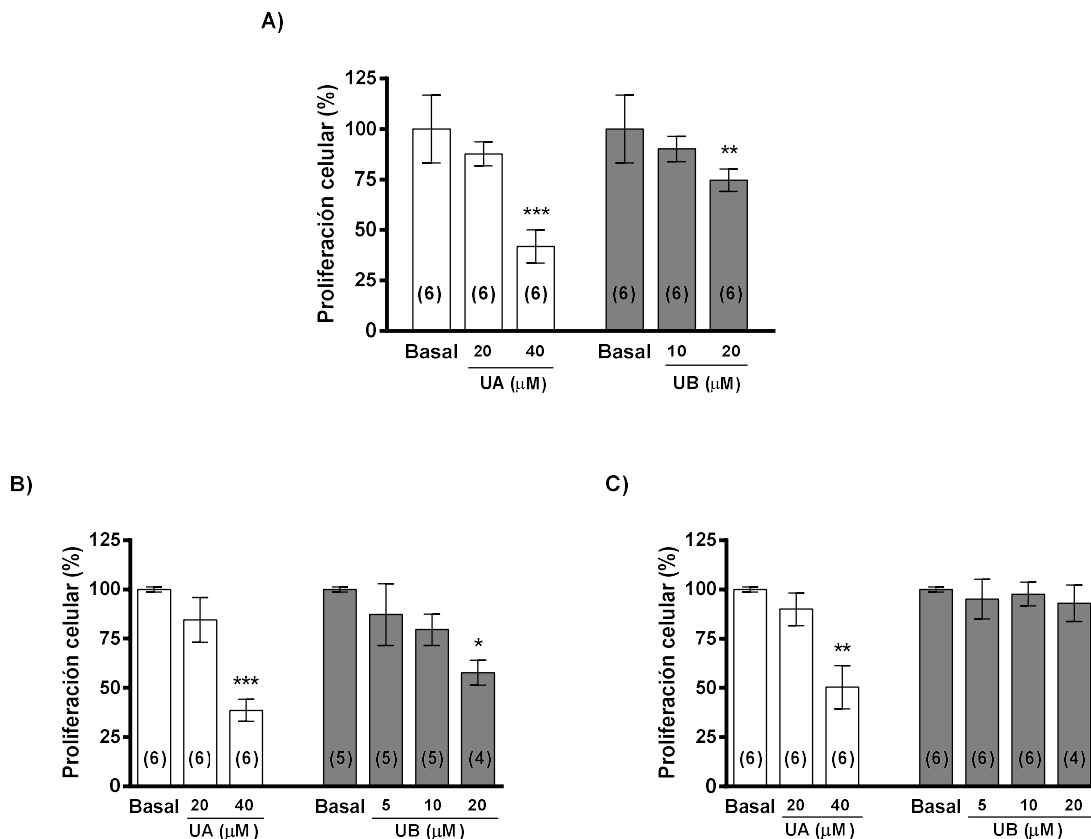


Figura 2.1: Efecto de las urolitinas sobre la proliferación de células endometriales. Los cultivos celulares primarios estromales (A) de pacientes con EDT; y las células St-T1b (B) y 12Z (C); se trataron con UA 20 y 40 μM , Uro B 5, 10 y 20 μM , o vehículo (grupo basal) durante 24 h. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo MTS. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del basal, media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

Las UA y UB ejercen efectos antiproliferativos sobre los distintos cultivos de células endometriales.

Nuevamente, subrayamos que el trabajo *in vitro* con células endometriales humanas primarias es dificultoso, razón por la cual de aquí en adelante la investigación sobre el efecto de las urolitinas **UA** y **UB** en el desarrollo experimental de la EDT se continuó utilizando las líneas celulares **12Z** y **St-T1b** como modelo *in vitro* representativo.

Evaluación del ciclo celular de células endometriales epiteliales y estromales.

A continuación se evaluó el efecto de las urolitinas sobre la progresión del ciclo celular en cultivos de St-T1b y 12Z. Para ello, las células fueron tratadas con UA 40 μ M; UB 20 μ M; o vehículo (basal) durante 24 h.

En células St-T1b ambas urolitinas produjeron un aumento significativo del porcentaje de células en fase S (Figura 2.2 superior), mientras que en las células 12Z, un efecto similar sólo se observó con la UA. Por otro lado, ambas urolitinas produjeron un aumento del porcentaje de células en la fase G2/M en las células 12Z (Figura 2.2 inferior).

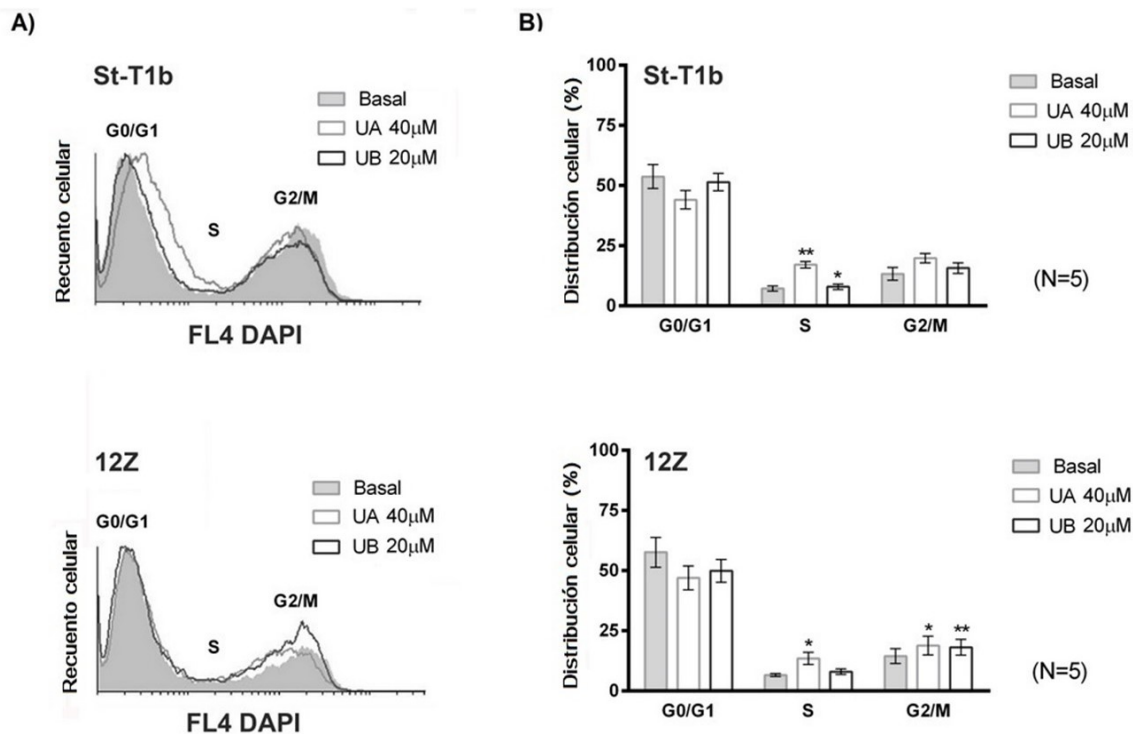


Figura 2.2: Efecto de las urolitinas sobre la progresión del ciclo celular en cultivos de células St-T1b y 12Z. Los cultivos celulares se trataron con UA 40 µM, UB 20 µM, o vehículo (grupo basal) durante 24 h. El ciclo celular fue evaluado por CyStain (Partec) y analizado por citometría de flujo. (A) histogramas correspondientes a una repetición y representativos de los resultados de estos ensayos. (B) Cuantificación de los datos de citometría de flujo según la fase del ciclo celular para los grupos indicados, expresados como distribución celular (%). Los resultados se expresan como media ± SEM. *p < 0.05 y **p < 0.01 respecto del Basal. El número de réplicas N=5.

Las UA y UB inducen el arresto del ciclo celular en los cultivos de células St-T1b y 12Z.

Evaluación de la apoptosis de células endometriales epiteliales y estromales.

Para examinar la posible contribución de la apoptosis en los cambios observados en la viabilidad celular, se evaluó el efecto del tratamiento con las urolitinas sobre las

células St-T1b (Figura 2.3 A superior) y células 12Z (Figura 2.3 A inferior) mediante el ensayo Anexina V-FITC. Al igual que en el ensayo anterior, los cultivos celulares fueron tratados con UA 40 μ M; UB 20 μ M o vehículo (basal) durante las 24 h previas al experimento.

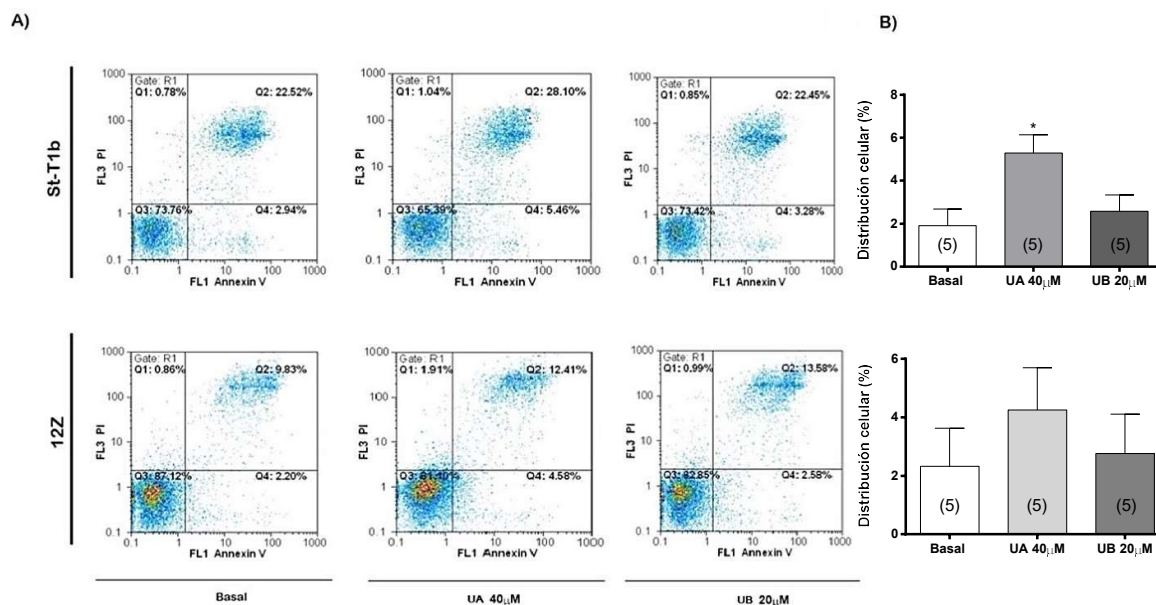


Figura 2.3: Efecto de las urolitinas sobre la apoptosis de cultivos de células St-T1b y 12Z. Los cultivos celulares fueron tratados con UA 40 μ M; UB 20 μ M; o vehículo (grupo basal) durante 24 h. La apoptosis fue evaluada por el kit de detección de apoptosis de Annexin V-FITC (BD Pharmingen) y analizada por citometría de flujo. (A) Diagrama representativo del análisis por citometría de flujo. (B) Cuantificación de los datos de células apoptóticas (células que tiñen positivo para el anexo V de FITC y negativo para PI) expresados como distribución celular (%). Los resultados se expresan como media \pm SEM. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra *p < 0.05 respecto del Basal.

Se encontró que la UA produjo alteraciones significativas únicamente en las células St-T1b, aumentando los porcentajes de células apoptóticas (Figura 2.3 B superior), mientras que no produjo efectos sobre las células 12Z (Figura 2.3 B inferior). Por su

parte, la UB, no modificó los porcentajes de células apoptóticas en ninguno de los cultivos celulares evaluados.

La UA provoca un aumento en el porcentaje de células apoptóticas en cultivos de células endometriales estromales St-T1b.

Efecto de las urolitinas, *in vitro*, sobre el comportamiento de células endometriales humanas.

Como mencionamos previamente, las alteraciones en la supervivencia y el crecimiento celular si bien contribuyen a la persistencia de lesiones endometriósicas, no son las únicas modificaciones decisivas para el desarrollo de la enfermedad. Una mayor adhesión y un comportamiento invasivo más agresivo, podrían promover el establecimiento de las lesiones.

Efecto de las urolitinas sobre la adhesión celular.

Al evaluar el efecto directo de las urolitinas sobre la adhesión celular, observamos que el tratamiento con UB fue el único capaz de disminuir estadísticamente el porcentaje de células ST-T1b (Figura 2.4 A) y 12Z (Figura 2.4 B) adherentes; mientras que el tratamiento con UA no provocó ningún cambio significativo.

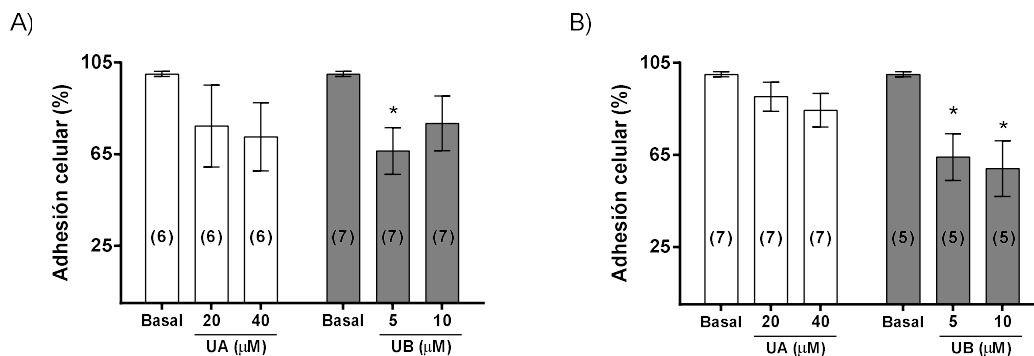


Figura 2.4: Efecto de las urolitinas sobre la adhesión celular de cultivos de células St-T1b y 12Z. Los cultivos celulares St-T1b (A) y 12Z (B) se trataron con UA 20 y 40 μ M; UB 5 y 10 μ M; o con vehículo (grupo basal). Después de 24 h, las células se recolectaron y se dejaron adherir a placas de cultivo nuevas durante 1 h y el número de células adheridas se contó bajo un microscopio. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0.05$ respecto del Basal. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

El pre-tratamiento durante 24 h con UB inhibe la adhesión celular de células endometriales St-T1b y 12Z.

Efecto las urolitinas sobre la migración de células endometriales humanas.

Cuando evaluamos la migración celular utilizando el ensayo de cicatrización de herida por *scratch*, observamos que en las células St-T1b la UA resultó más efectiva en inhibir la migración celular, ya que los cambios estadísticamente significativos comienzan a manifestarse a tiempos cortos (6 h), resultando aún más evidente a las 24 h de tratamiento (Figura 2.5 B superior); mientras que la UB lo hace recién a las 24 h.

En las células 12Z, la inhibición de la migración por parte de la UB también se pudo constatar resultando significativa a las 24 h de tratamiento (Figura 2.5 B inferior). Por su parte, la UA no causó un efecto significativo sobre las células 12Z.

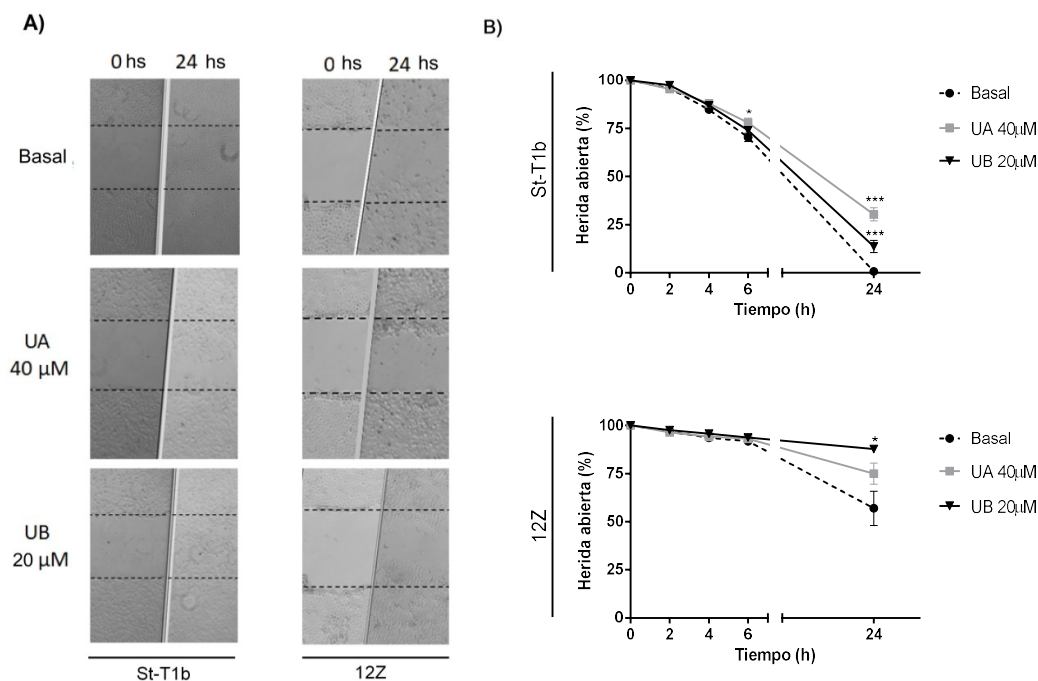


Figura 2.5: Efectos de las urolitinas sobre la migración celular de cultivos de células St-T1b y 12Z. Los cultivos celulares fueron tratados con UA 40 μM; UB 20 μM; o vehículo (grupo basal). (A) Las líneas negras punteadas indican los bordes de la herida al principio del ensayo y se registraron a las 0h, 2h, 4h, 6h y 24h después del *scratch*. (B) La tasa de cicatrización para los diferentes tiempos se calculó utilizando el método de análisis de la relación de cierre, el cual normaliza las áreas de heridas a distintos tiempos con respecto al área de la herida en el tiempo 0 h. El análisis cuantitativo de la herida abierta se realizó utilizando el software Image J. Cada punto representa la media de cinco experimentos (N=5), realizados por duplicado. Se compararon las tasas de cicatrización a los distintos tiempos para cada tratamiento respecto a la tasa de cicatrización del vehículo (basal) *p < 0.05 y ***p < 0.001

Las UA y UB alteran la migración celular de las líneas celulares endometriales.

Efecto las urolitinas sobre la invasión de células de epitelio endometrial humano.

A continuación evaluamos el efecto de las urolitinas sobre la capacidad invasiva de la línea celular epitelial endometriósica 12Z, la cual constituye un modelo consolidado para el estudio de la invasión de células endometriósicas (Zeitvogel et al., 2001). Además previamente mostró un comportamiento invasivo en ensayos similares (Chelariu-Raicu et al., 2016; Eggers et al., 2016).

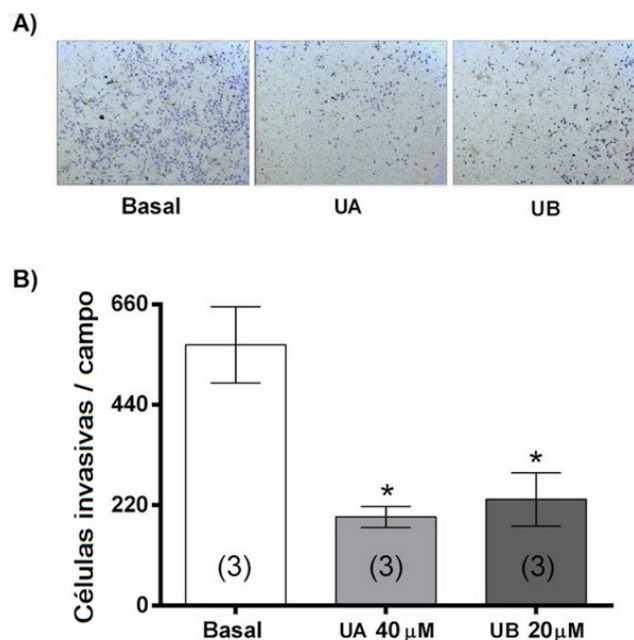


Figura 2.6: Efecto de las urolitinas sobre la invasión de cultivos de células y 12Z. Las células 12Z fueron tratadas con UA 40 μ M; UB 20 μ M; o vehículo (grupo Basal), y añadidas por duplicado a los compartimentos superiores de las Cámaras de Invasión de Matrigel. Luego de 24 h se fijaron las células en la superficie inferior de la membrana de matrigel y se tiñeron con Diff-Quik dye. Se fotografiaron las membranas de matrigel (A) y se contaron y cuantificaron las células invasoras (B). Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0.05$ respecto del Basal. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

Como se observa en la Figura 2.6, ambas urolitinas fueron efectivas en la disminución significativa de la invasión celular la cual se manifiesta en un menor número de células retenidas en la membrana de matrigel.

UA y UB disminuyen la invasión celular de la línea celular epitelial endometriósica 12Z.

Efecto de las urolitinas sobre la expresión de genes que regulan la migración celular y el crecimiento invasivo.

En vista de los hallazgos, se procedió a evaluar el efecto de las urolitinas sobre la expresión de genes conocidos por regular los procesos que resultaron afectados en nuestros ensayos, como la migración, adhesión, invasión y proliferación celular. Coincidentemente con nuestras observaciones, estos procesos ya fueron destacados en otras investigaciones por estar alterados en el tejido endometrial de pacientes con EDT respecto de mujeres control (Adammek et al., 2013; Bałkowiec et al., 2018; Chelariu-Raicu et al., 2016; Schneider et al., 2013).

Con este propósito, la expresión de ARN de las metaloproteinasas MMP2, MMP3 y MMP9, del inhibidor de metaloproteinasas Timp1, de los reguladores del citoesqueleto Rac1 y Rock2, y de los receptores de adhesión a la matriz SDC1 e ITGAV; fue analizada por qPCR en cultivos primarios de células estromales derivadas de pacientes con EDT, en células St-T1b y en células 12Z (Figura 2.7 A, B y C respectivamente).

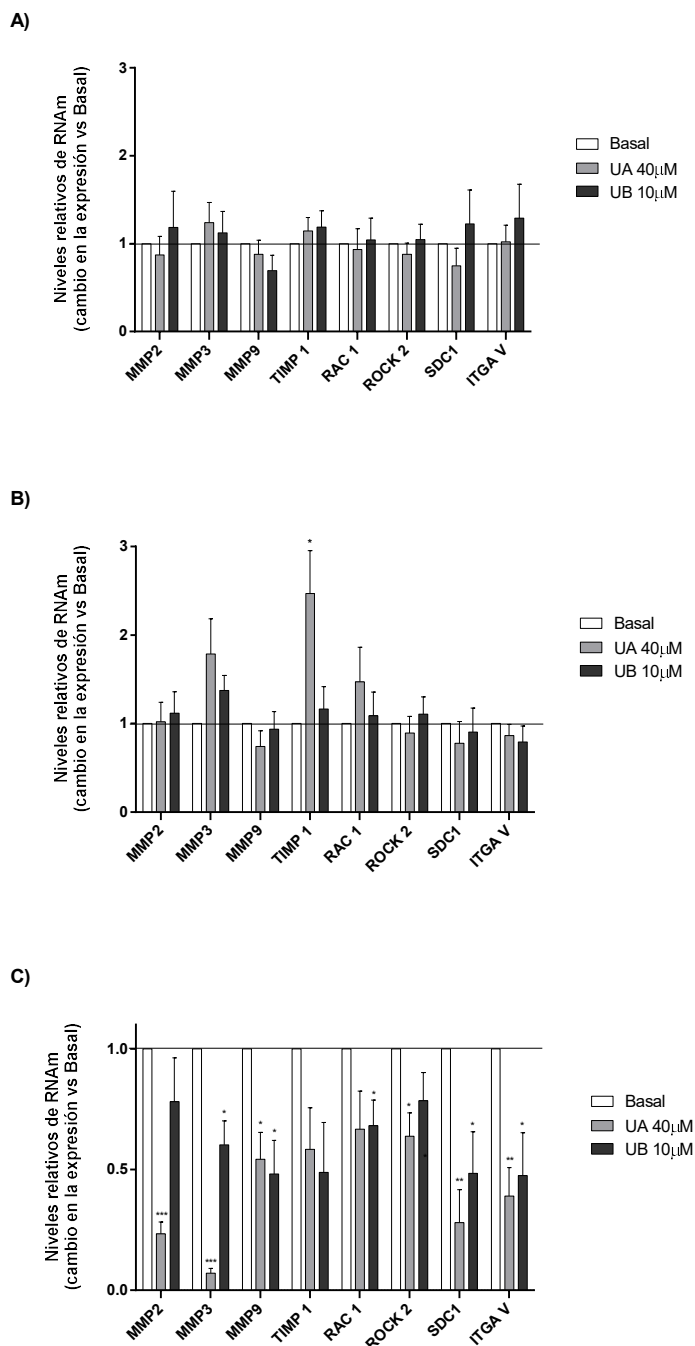


Figura 2.7: Efecto de las urolitinas sobre la expresión de genes que regulan la migración celular y el crecimiento invasivo. Los cultivos celulares de células estromales derivadas de lesiones endometriósicas (A), células St-T1b (B) y 12Z (C), fueron tratadas con UA 40 μ M; UB 10 μ M; o vehículo (grupo Basal) durante 24 h. El ARN fue aislado y convertido en cADN, para analizarlo mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el método ABI PRISM 7300 Sequence Detection System. Los resultados se expresan como media \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01 ***P < 0.001 respecto del Basal. El número de réplicas es N=6

Observamos que el tratamiento con UA y UB de cultivos primarios de células estromales no afectó la expresión de los genes estudiados (Figura 2.7 A). Sin embargo, se manifestó un aumento significativo en la expresión del inhibidor de proteinasas TIMP-1 en células St-T1b tratadas con UA (Figura 2.7 B).

En las células 12Z (Figura 2.7 C), la expresión de MMP2 fue significativamente disminuida por UA, mientras que la expresión de MMP3 y MMP9 se redujo por ambas urolitinas; lo que podría explicar el efecto anti-invasivo efectuado por los metabolitos sobre las líneas celulares. Además, la UA redujo significativamente los niveles de expresión de ROCK2, mientras que el tratamiento con la UB se asoció con la desregulación del Rac1; proporcionando una vinculación entre los tratamientos y la alteración de la motilidad exhibidos por las células 12Z. Finalmente, los receptores de adhesión matricial y los (co)receptores de señalización, SDC1 e ITGAV, fueron desregulados en el tratamiento de células 12Z tanto con UA como con UB.

Las UA y UB alteran la expresión de genes que regulan la migración y el crecimiento invasivo de las líneas celulares endometriales St-T1b y 12Z.

2.3.4 *In vivo*

A partir de los resultados obtenidos *in vitro*, y de igual forma que procedimos con el AE, pasamos a evaluar el efecto de los dos metabolitos sobre el desarrollo de la EDT experimental en un modelo murino *in vivo*.

Efecto de UA y UB, *in vivo*, sobre el ciclo estral.

Al igual que se realizó en el *in vivo* anterior, se ciclaron todos los animales durante las 2 últimas semanas de tratamiento.

Al analizar los resultados, no se observaron diferencias significativas en el número de ciclos ni en la duración de los mismos entre los diferentes grupos (Figura 2.8 A y B), así como tampoco se manifestaron diferencias en el tiempo transcurrido en cada fase del ciclo estral (Figura 2.8 C); demostrando que el tratamiento con las urolitinas no genera ninguna alteración respecto al grupo control, así como tampoco respecto al grupo Sham.

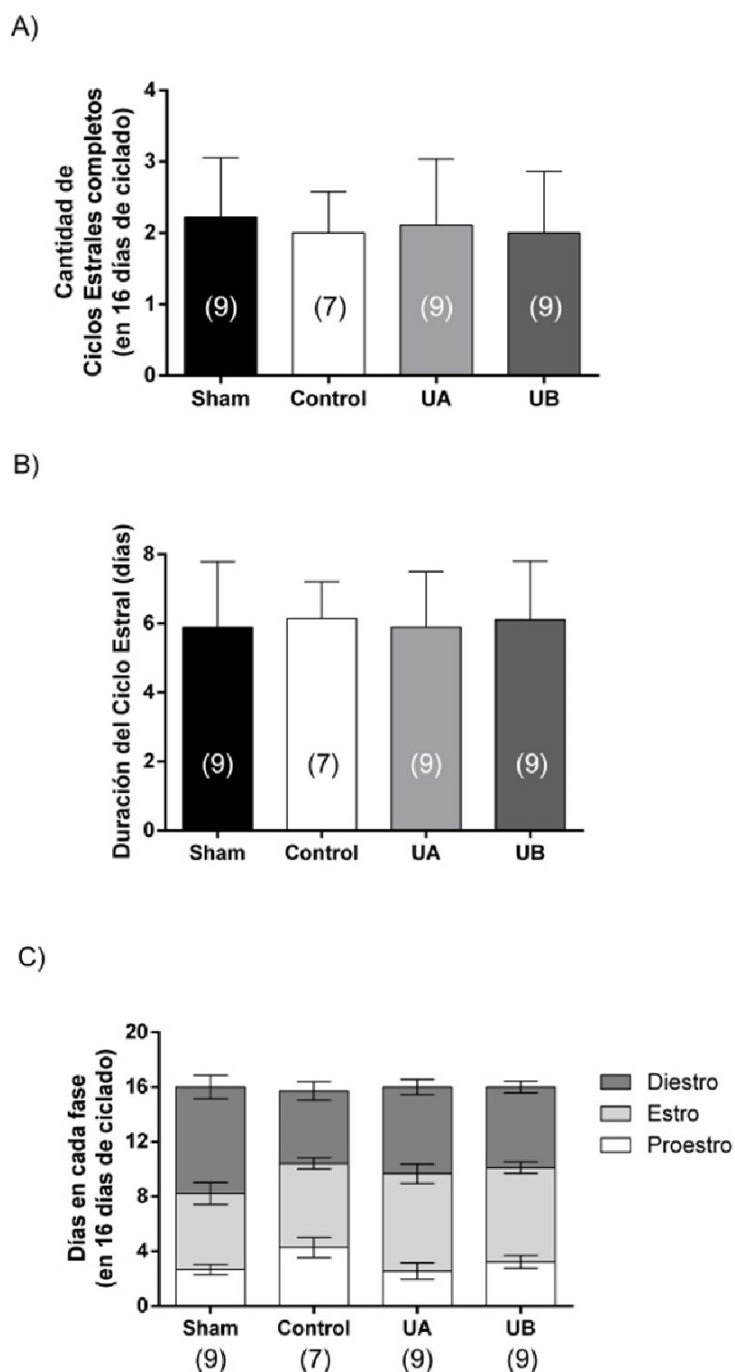


Figura 2.8: Análisis del ciclo estral en el modelo *in vivo* de EDT. Los animales se sometieron a una cirugía de inducción de la EDT. El ciclo estral de ratonas BALB/c Sham, Control, y UA o UB 2.5mg AE/kg/día. Número de ciclos estrales en 16 días (A). Duración del ciclo estral (B). Porcentaje del tiempo transcurrido en cada fase del ciclo estral (C). Los resultados se expresan como media \pm SEM. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

El tratamiento con UA y UB, no altera el normal desarrollo del ciclo estral en el modelo murino de EDT.

Efecto de UA y UB, *in vivo*, sobre el volumen y número de lesiones endometriósicas.

El monitoreo diario de los animales y el registro de sus pesos individuales cada 3 días; expuso que ni la enfermedad ni el tratamiento generaron modificaciones en el peso corporal (Figura 2.9 A), el consumo de alimento, el comportamiento, o los niveles de actividad de los animales.

Por otro lado, los resultados de la examinación macroscópica de la cavidad peritoneal revelaron que todos los animales, excepto de aquellos pertenecientes al grupo Sham, se encontraron lesiones desarrolladas o en su defecto los tejidos suturados aunque no desarrollados, confirmando la eficiencia de la cirugía y respaldando el modelo experimental utilizado.

En cuanto al porcentaje de lesiones desarrolladas por ratón (Figura 2.9 B) se observó una sustancial disminución en los animales tratados respecto al grupo control. En el grupo tratado con UB los animales desarrollaron alrededor del 50% de las lesiones implantadas quirúrgicamente; mientras que en el grupo tratado con UA exclusivamente un animal desarrolló una única lesión. Recordemos que tratándose de un modelo que busca evaluar una terapéutica sobre lesiones ya desarrolladas, estos resultados implican el tratamiento con la UA ocasionó la involución total de las mismas (Chen et al., 2010; Eggermont et al., 2005).

A su vez, al comparar los volúmenes promedio de las lesiones desarrolladas (Figura 2.9 C) se observó que el tratamiento con UB causó una disminución estadísticamente significativa respecto del grupo control.

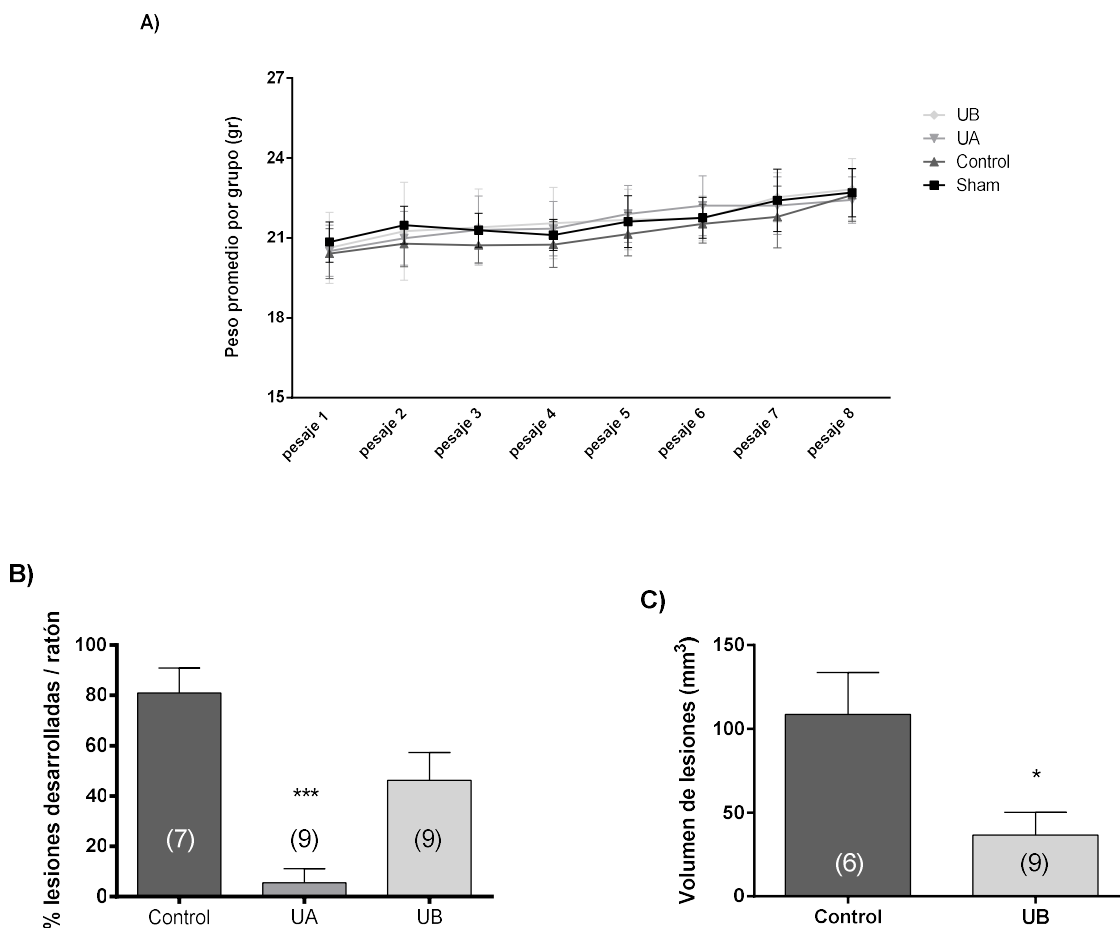


Figura 2.9: Efecto de las urolitinas sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas. Luego de 4 semanas de tratamiento los animales fueron sacrificados y se examinó la cavidad peritoneal. A) Progresión de la media del peso por grupo a lo largo del tratamiento. B) Media de lesiones desarrolladas por ratón en cada grupo experimental. C) Media del volumen de las lesiones desarrolladas por ratón en cada grupo experimental. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto del grupo Control. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

Dado que en el grupo tratado con UA sólo un animal desarrolló una única lesión, el mismo fue considerado un dato atípico. De esta forma, a partir de este punto los análisis comparativos se realizaron entre las lesiones desarrolladas por el grupo tratado con UB y el grupo control.

El tratamiento con UA inhibió completamente el desarrollo de las lesiones endometriósicas en el modelo murino de EDT, mientras que el tratamiento con UB disminuyó tanto el porcentaje de lesiones desarrolladas como el volumen de las mismas.

Evaluación de la proliferación celular en las lesiones endometriósicas.

En vista de los resultados macroscópicos se procedió a la extracción de las lesiones, las cuales fueron fijadas a fin de preparar el tejido para su evaluación histológica.

En una primera instancia se llevó a cabo la evaluación de la proliferación celular mediante inmuno-histoquímica. Se utilizó como marcador el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para cuantificar las células que presentaban una proliferación celular activa.

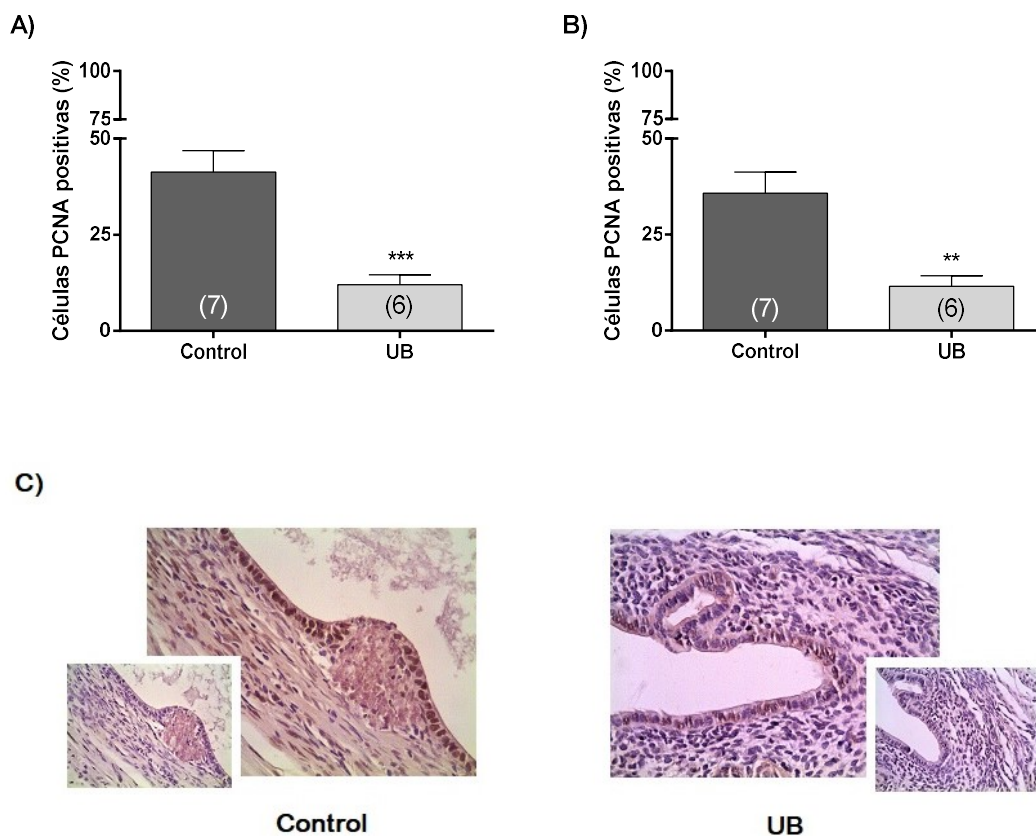


Figura 2.10: Efecto de la UB sobre la proliferación de células epiteliales y estromales en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón. Las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron para evaluar la proliferación celular mediante inmunohistoquímica de PCNA luego de 4 semanas de tratamiento. Se cuantificó el porcentaje de células epiteliales (A) y estromales (B) PCNA+. Micrografías representativas de la inmunomarcación de PCNA (C). Recuadro: controles negativos sin el agregado del respectivo anticuerpo primario. Magnificación $\times 400$. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto del grupo Control. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

Como puede verse en la Figura 2.10, el tratamiento con UB disminuyó de forma significativa el porcentaje de células tanto epiteliales como estromales PCNA positivas en las lesiones endometriósicas (Figura 2.10 A y B, respectivamente), en comparación

con el grupo control. En la microfotografía tomada de un campo representativo de una lesión de cada grupo, se puede observar que la inmuno-marcación del antígeno nuclear es específica (Figura 2.10 C).

El tratamiento con UB inhibió la proliferación en lesiones endometriósicas en el modelo murino de EDT.

Evaluación de la apoptosis en las lesiones endometriósicas.

También se cuantificó y analizó el porcentaje de células en apoptosis en las lesiones endometriósicas mediante la técnica de TUNEL sobre los cortes histológicos. Complementaria y consistentemente con los resultados obtenidos para proliferación, se reveló que el tratamiento con UB incrementó significativamente el porcentaje de células tanto epiteliales como estromales TUNEL positivas en las lesiones endometriósicas, en comparación con el grupo control (Figura 2.11 A y B respectivamente). Nuevamente, las microfotografías tomadas muestran la especificidad de la técnica (Figura 2.11 C).

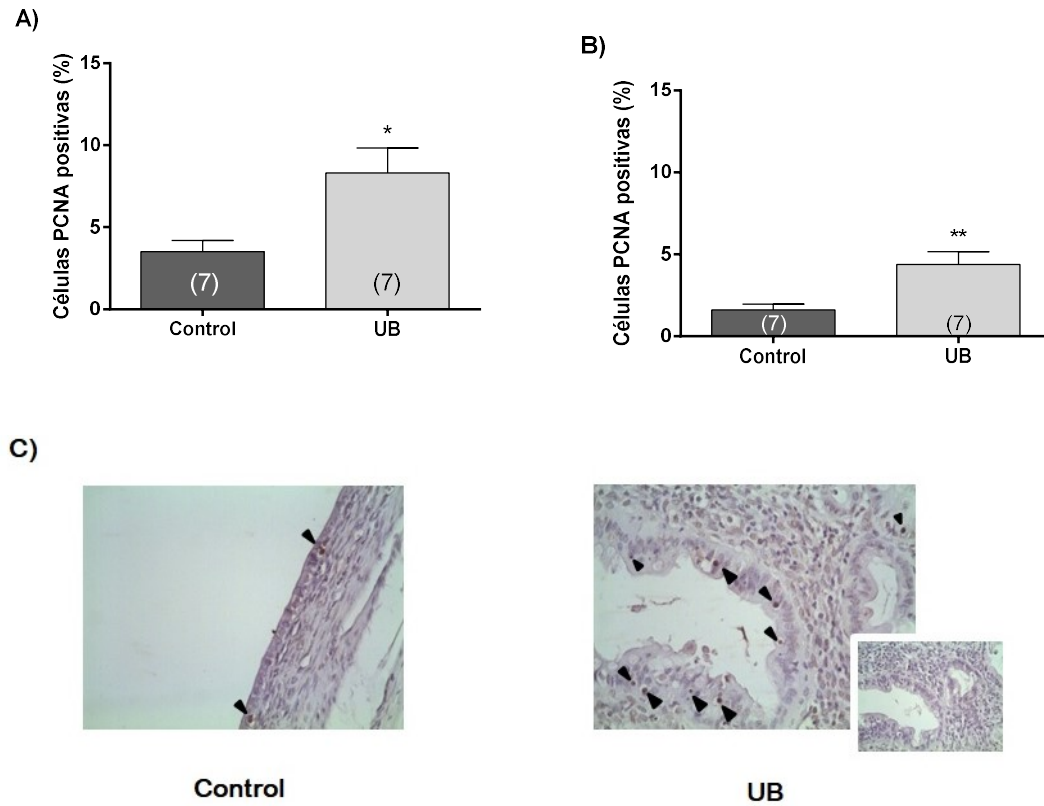


Figura 2.11: Efecto de la UB sobre la apoptosis de células epiteliales y estromales en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón. Las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron para evaluar la proliferación celular mediante TUNEL luego de 4 semanas de tratamiento. Se cuantificó el porcentaje de células epiteliales (A) y estromales (B) TUNEL+. Micrografías representativas de la marcación de TUNEL (C). Recuadro: controles negativos incubados en ausencia de enzima TdT. Magnificación x400. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto del grupo Control. El número de réplicas (N) se expresa entre paréntesis en cada barra.

El tratamiento con UB indujo la apoptosis en lesiones endometriósicas en el modelo murino de EDT.

DISCUSIÓN

La EDT es una enfermedad estrógeno dependiente crónica, benigna y con una alta tasa de recurrencia, que afecta a las mujeres en edad reproductiva. Es una patología cuyo diagnóstico aún representa un desafío, lo cual dificulta la determinación certera de su prevalencia y retrasa su tratamiento. Por su naturaleza crónica, requiere una terapia a largo plazo que incluya no sólo un abordaje interdisciplinario en el que se acompañe a las pacientes física y psicológicamente; sino también un compromiso político de capacitación profesional tanto del personal de la salud como de investigación, ya que la EDT afecta significativamente la calidad de vida de una gran proporción de la población.

Hoy en día las únicas alternativas terapéuticas son farmacológicas o quirúrgicas, y se enfocan en atenuar los síntomas sin interferir en los eventos etiopatogénicos. Es por esta razón que, incluso cuando el abordaje quirúrgico erradique las lesiones, hay riesgo de complicaciones debido a los efectos secundarios adversos del tratamiento prolongado lo que conlleva altas tasas de recurrencia.

Como se mencionó anteriormente, la terapéutica actual no ofrece una cura para la enfermedad. Esto evidencia la necesidad de una mejor comprensión de los síntomas clínicos y deseos particulares de las pacientes, a fin de encontrar una forma de abordar más adecuadamente su tratamiento. Haciendo especial hincapié en subsanar las limitaciones actuales, y teniendo en cuenta el creciente interés que han mostrado las mujeres en las terapias complementarias y alternativas, es que decidimos plantearnos como objetivo general de la presente tesis evaluar el efecto del AE, la UA y la UB, en el

desarrollo de la EDT en diferentes modelos de la enfermedad y estudiar la regulación de mecanismos involucrados en dichos efectos.

Este trabajo surgió como parte de un proyecto más amplio que nuestro laboratorio viene desarrollando desde hace más de 6 años, cuyo objetivo es la búsqueda de posibles fitoterapéuticos para el tratamiento de la EDT. De esta manera, hemos evaluado productos naturales como el resveratrol y el EGCG que demostraron ser efectivos en la inhibición del desarrollo de la enfermedad en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Ricci et al., 2013); y también el ácido carnósico, el ácido rosmarínico y la wogonina que manifestaron un claro efecto antiproliferativo en dichos modelos (Ferella et al., 2018).

Basándonos en los modelos puestos a punto en estos trabajos y teniendo en cuenta la ruta metabólica de los compuestos a analizar, decidimos comenzar la investigación evaluando el efecto del AE sobre el desarrollo de la enfermedad. Es así que enfrentamos el primer objetivo específico y analizamos su acción sobre la supervivencia de células estromales y epiteliales de endometrio *in vitro*. Para ello se establecieron cultivos primarios a partir de biopsias endometriales de mujeres controles y pacientes con EDT, los cuales a continuación fueron tratados por 24 y 48 h con dos dosis del compuesto. Observamos que el AE no indujo cambios significativos sobre la proliferación de las células endometriales de cultivo primario en ninguna de las condiciones ensayadas.

Es importante insistir en que, tal como fue demostrado en trabajos previos de nuestro propio laboratorio (Bilotas et al., 2007; Meresman et al., 2003), el comportamiento de las células obtenidas a partir de biopsias de pacientes con EDT y mujeres controles no muestra diferencias significativas en relación a la biopsia de procedencia. En nuestra opinión, la manipulación para disgregar la biopsia y aislar los diferentes tipos celulares, es la causa de estas observaciones, ya que se pierden las condiciones características e

influyentes del microambiente peritoneal. En base a estas observaciones es que decidimos agrupar bajo el mismo análisis ambos tipos de cultivos primarios.

Asimismo, cultivos de las líneas celulares de tejido endometrial epitelial ECC-1 y estromal T-HESCs, previamente establecidas como modelo experimental de enfermedad, fueron examinadas en iguales condiciones: 24 y 48 h con 50 y 100 μM de AE. Nuevamente observamos que el AE no indujo cambios significativos sobre la proliferación de las líneas celulares en ninguna de las condiciones ensayadas, lo cual resultó coincidente con el patrón observado en los cultivos primarios. A su vez, nuestros resultados son íntegramente equiparables a aquellos obtenidos por Zhang y col., en donde demostraron que el AE en dosis crecientes hasta 50 μM no resulta efectivo a la hora de regular la proliferación de cultivos celulares T-HESCs y ECC-1 (Zhang et al., 2016b). También, concuerdan con investigaciones previas realizadas en diferentes células cancerosas. Kallio y col. (Kallio et al., 2013) demostraron que el tratamiento con AE no fue capaz de disminuir la viabilidad de las células de cáncer hepático HepG2; lo cual fue corroborado años más tarde por Liberal y col., quienes trataron células HepG2 y otras líneas de carcinomas humanos con AE 75 μM , sin encontrar una actividad citotóxica significativa del compuesto sobre las células (Liberal et al., 2017).

Como mencionamos previamente, dado que los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación fueron similares entre los cultivos primarios y las líneas celulares ECC-1 y T-HESCs, y frente a las ventajas que confiere el manejo de líneas celulares; es que decidimos continuar evaluando el efecto del AE sobre diferentes parámetros utilizando únicamente dichas líneas.

Por otro lado, los defectos en los puntos de control del ciclo celular se asocian con un aumento de la inestabilidad genética y la proliferación celular descontrolada, razón por la cual el arresto del ciclo celular suele considerarse una de las estrategias para el control del crecimiento celular en tejidos. Es por eso que, si bien los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación celular no fueron alentadores, decidimos evaluar la progresión del ciclo celular ya que en investigaciones previas se estableció que el mayor efecto de AE reside en su capacidad de provocar la inhibición del mismo (Ríos et al., 2018).

La marcación del ADN con yoduro de propidio y su posterior análisis por citometría de flujo, es una técnica sencilla que permite reconocer según la cantidad de ADN el estadio del ciclo en el que se encuentra la célula. Una célula en G₀/G₁ posee la cantidad de ADN correspondiente a una célula diploide (2N), mientras que una célula que se encuentra en el estadio G₂/M posee el doble de material genético (4N) ya que su ADN ha sido duplicado durante la fase de síntesis (S).

Tras estimular las células ECC-1 y T-HESCs con AE 50 y 100 μ M por 24 o 48 h, observamos un arresto del ciclo celular en la fase G₂/M únicamente en las células T-HESCs luego de 48h de tratamiento con la dosis máxima. Efectos similares sobre el ciclo celular de esta línea fueron observados anteriormente al utilizar otros compuestos naturales como el ácido carnósico y la wogonina evaluados por nuestro grupo de trabajo (Ferella et al., 2018). Por otro lado la apigenina, un flavonoide natural presente en diversas frutas y verduras como el perejil, el apio y la manzanilla (Ujiki et al., 2006); fue capaz de inducir el arresto en esta misma fase del ciclo celular en diferentes líneas celulares de cáncer pancreático como estrategia de inhibición del crecimiento celular.

En nuestro análisis, dicho arresto del ciclo celular no se vio reflejado en el número de células metabólicamente activas detectadas mediante el ensayo de WST-1 al tratar las células en las mismas condiciones (AE 100 μ M por 48 h). Si bien esto nos resultó llamativo, observaciones similares fueron obtenidas anteriormente en diferentes investigaciones realizadas con AE y otros compuestos de origen natural. En los ensayos realizados con apigenina (Ujiki et al., 2006) sobre cultivos de células de cáncer de páncreas, se observó una inhibición en la síntesis de ADN evaluada por la incorporación de timidina y un arresto del ciclo celular en la fase G2/M detectados a las 24 h. Esto se correlacionó con una disminución en el número de células manifestado recién en un período de 72 h. Tras estos hallazgos, los investigadores postularon que el número de células en el grupo control aumentaba cada 24 h en casi todas las líneas celulares, mientras que en las tratadas con apigenina aumentaban a un ritmo más lento.

En lo que respecta al AE, se ha reportado que líneas celulares de carcinoma endometrial KLE y AN3CA tratadas con una dosis de AE 20 μ M por 24, 48 y 72 h; mostraron una disminución significativa de la viabilidad celular recién a partir de las 48h. Sin embargo, durante la misma investigación, el arresto del ciclo celular en la fase G1 se evidenció a las 24h de tratamiento (Yizi Wang et al., 2019).

Además, en otro trabajo, de Liberal y col. (Liberal et al., 2017) evaluaron el tratamiento con AE y tres de sus metabolitos observando que estos últimos provocaron una reducción significativa de la viabilidad celular a las 48 h, mientras que el arresto del ciclo celular se evidenció a partir de las 24 h de tratamiento. A su vez concluyeron que el ensayo de viabilidad basado en resazurina, si bien se ha utilizado ampliamente como indicador de mitocondrias metabólicamente activas, puede sobre-estimar o subestimar el número de células viables. Al mismo tiempo, postularon que en los casos en que las

células fueran metabólicamente defectuosas, los posibles efectos antiproliferativos del tratamiento podrían no reflejarse directamente en su número, ya que son evaluados mediante colorantes que dependen de la actividad metabólica de las mismas.

Todo esto refuerza dos puntos interesantes de considerar. En primer lugar, la idea de que el ensayo de viabilidad óptimo dependerá del tipo celular y las condiciones de cultivo utilizadas, por lo que posiblemente lo más adecuado sería aplicar más de un método para confirmar los resultados de los ensayos individuales (Stoddart, 2011). Y por otro lado, esboza la posibilidad de que la disminución en el número de células esperable en respuesta al arresto celular observado al tratar las T-HESCs con AE 100 μM (Figura 1.2), se produjera en tiempos posteriores a las 48 h. Cualquiera de estas hipótesis deberían corroborarse con estudios futuros, ya que los datos con los que contamos hasta el momento son insuficientes para pronunciar una conclusión.

A partir de estos resultados emprendimos una exhaustiva búsqueda bibliográfica que nos ayudara a comprender los escasos efectos del AE sobre el crecimiento celular, y fue así que hallamos un trabajo en el que se demostraba que el compuesto era un fuerte antioxidante al estar presente en el medio de cultivo celular pero no mostraba ninguna actividad intracelular (Kallio et al., 2013) lo cual los autores atribuían a su baja permeabilidad a través de la membrana celular. Esto coincidía con otro trabajo en el que no se detectaron metabolitos derivados del AE en el medio celular y sólo se encontraron rastros del mismo dentro de las células tras incubar los cultivos celulares (González-Sarrías et al., 2010). Fue así que basándonos en estos trabajos, decidimos orientar la investigación hacia los posibles efectos del tratamiento con AE sobre el comportamiento celular.

Un enfoque sobre el cual nuestro laboratorio ya ha trabajado (Ricci, 2012), es la influencia del ambiente peritoneal en el desarrollo de las lesiones endometriósicas. La expresión aberrante de citoquinas y la inflamación pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la EDT (Baraña, 2014; Kyama et al., 2006); y se ha demostrado que citoquinas inflamatorias presentes en la cavidad peritoneal pueden facilitar la adhesión de aquellos fragmentos endometriales que alcancen la cavidad peritoneal (Bilotas, et al., 2010; Meresman et al., 2011; Sillem et al., 1999). En ese aspecto, nuestros resultados corroboraron dichas observaciones, ya que la adhesión celular de las líneas utilizadas como modelo de la enfermedad en nuestro laboratorio, resultó significativamente mayor en presencia de MC obtenidos a partir de explantes de pacientes con EDT respecto de pacientes control. Por otro lado, en el presente trabajo demostramos que el AE tiene un efecto directo sobre la adhesión celular tanto de cultivos de ECC-1 como de T-HESCs, ya que el pretratamiento durante 24 h con AE 50 y 100 μ M, redujo significativamente la habilidad de las células de adherirse a las placas de cultivo.

En lo que respecta a la naturaleza invasiva del tejido endometrial, estudios previos realizados en el marco de tesis doctorales en nuestro laboratorio (Ricci, 2012) expusieron cómo el líquido peritoneal de pacientes con EDT aumenta la migración de células endoteliales endometriales humanas, respecto a lo que ocurre en presencia del líquido peritoneal de mujeres controles. A su vez, existe evidencia sobre el efecto del AE sobre la motilidad e invasión de células cancerígenas, como por ejemplo la línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos PC-3 en los ensayos de migración e invasión celular (Pitchakarn et al., 2013). Frente a estos antecedentes, decidimos evaluar el efecto del AE sobre la migración de células ECC-1 y T-HESCs y observamos que la misma se vio inhibida debido al tratamiento.

En base a estos datos, confirmamos la influencia del ambiente peritoneal sobre los procesos cruciales en el desarrollo de las lesiones endometriósicas como la adhesión y migración celular, y sugerimos que el AE tiene un efecto inhibitorio sobre ambos procesos.

Los ensayos realizados hasta aquí fueron llevados a cabo sobre modelos *in vitro* de la enfermedad. Si bien la utilización de cultivos celulares representa una de las estrategias principales a la hora de investigar terapéuticas novedosas, es importante recordar sus limitaciones como por ejemplo la ausencia de interacción e interrelación entre los diferentes tipos celulares y con la matriz extracelular. De aquí la importancia de complementar los datos obtenidos evaluando el efecto del AE en un modelo experimental de EDT *in vivo*.

El modelo de EDT en ratones inmuno-competentes con el que contamos en el laboratorio, se basa en la inducción de la enfermedad a partir del trasplante autólogo de tres fragmentos de cuerno uterino al mesotelio del intestino lo que permite que los implantes establezcan vascularización propia, respondan a los niveles hormonales y respondan de forma similar a los tratamientos (Bilotas et al., 2010; Olivares et al., 2011; Ricci et al., 2011).

En primer lugar, nos interesó monitorear diariamente a los animales bajo experimentación, lo que nos permitió corroborar que el tratamiento con AE no interfiere en el comportamiento, el consumo de alimento y los niveles de actividad de los ratones.

A continuación, nos enfocamos en analizar la progresión del ciclo estral, concluyendo que el tratamiento con AE tampoco lo afectaba.

Una vez comprobada la integridad general de los animales procedimos a determinar el efecto del tratamiento sobre el mantenimiento y el crecimiento de lesiones endometriósicas ya establecidas. El AE fue administrado por vía oral ya que, además de ser la forma usual de consumo en humanos, se ha establecido que su metabolismo ocurre a nivel intestinal (Espín et al., 2013; Ríos et al., 2018).

Los resultados obtenidos mostraron que el AE no fue efectivo a la hora de disminuir el número ni el volumen de las lesiones endometriósicas *in vivo*. Como mencionamos anteriormente, los datos obtenidos respecto a al número de lesiones no nos sorprendieron ya que el esquema de tratamiento comenzó a las dos semanas de realizada la cirugía de inducción de la enfermedad. Como se reportó en trabajos previos realizados en un modelo similar, el establecimiento de las lesiones y su vascularización ocurren entre los 5 y 8 días posteriores a la implantación de los tejido (Eggermont et al., 2005); por lo que una disminución del número de las lesiones implicaría una remisión total de las mismas (Chen et al., 2010; Eggermont et al., 2005).

En lo que respecta al volumen de las lesiones, la situación es diferente. Es posible que la falta de efecto se deba a un complicación en el metabolismo del AE, lo que coincidiría con diversos trabajos en los que se postula que los efectos biológicos del AE podrían variar dependiendo de su biodisponibilidad y de cuales urolitinas son capaces obtenerse luego de su metabolismo (Del Rio et al., 2013; Dellaflora et al., 2013; González-Sarrías et al., 2015; Kawabata et al., 2019; Ludwig et al., 2015; Mertens-Talcott et al., 2006; Selma et al., 2014). Otra hipótesis es que la dosis de AE administradas no resultaran suficientes para generar los niveles de cambio necesarios para su detección estadística, lo cual es posible ya que al momento es escasa la bibliografía respecto a las dosis recomendables para un ensayo de estas características y en particular esta es el primer ensayo *in vivo*

realizado en nuestro modelo de EDT. Con los datos que contamos no es posible definir con exactitud esta cuestión, y consideramos que hubiese sido interesante evaluar la presencia de AE y/o de sus metabolitos principales en muestras de sangre provenientes de las ratonas bajo tratamiento, a fin de confirmar su capacidad metabólica y cuantificar la dosis que efectivamente llega al sistema.

Como se acabó de mencionar, en varios reportes se ha establecido que la absorción de AE es muy baja y que es metabolizado en el colon por la microbiota intestinal dando como producto final una variedad de urolitinas (Espín et al., 2013; Landete, 2011; Mertens-Talcott et al., 2006; Seeram et al., 2006). Estos dos aspectos sugieren que probablemente sean las urolitinas las verdaderas moléculas bioactivas responsables de los efectos beneficiosos para la salud tras el consumo de alimentos ricos en AE (Espín et al., 2013; Barberán et al., 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, y en vista de los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* durante la primer parte de la presente tesis, es que nos propusimos profundizar en los efectos del AE, pero esta vez enfocándonos directamente en sus dos metabolitos más abundantes, las urolitinas A y B, lo cual nos permitiría superar cualquier obstáculo relativo al metabolismo (Press & Hardcastle, 2007) y a su baja disponibilidad intracelular (Kallio et al., 2013).

Al igual que se procedió con el AE, el primer desafío fue evaluar el efecto de estos metabolitos sobre la proliferación de células epiteliales y estromales endometriales humanas. Para ello establecimos cultivos primarios a partir de biopsias endometriales de mujeres con EDT, y trabajamos también con las líneas celulares St-T1b y 12Z. Tanto los cultivos primarios como las líneas celulares fueron tratados con UA o UB durante

24h. Observamos una disminución significativa luego del tratamiento con ambas urolitinas en las dosis más altas tanto en los cultivos primarios como en las células St-T1b, mientras que en las células 12Z sólo la UA fue efectiva. Estos resultados coinciden con reportes previos en los que se observaron que la UA y la UB son inhibidores eficaces de la proliferación de diferentes líneas de cáncer endometrial (Tabla i.1). En estos trabajos, y en coincidencia con nuestros resultados, la UA resultó ser la más eficaz.

El efecto antiproliferativo de las urolitinas se ha observado también en numerosos tipos celulares. Por ejemplo, la UA, la UB y la UC mostraron un efecto antiproliferativo en las líneas celulares de carcinoma transicional de la vejiga humana (UMUC3), células de carcinoma hepático humano (HepG2), células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), y células de cáncer de mama (MCF-7) (Liberal et al., 2017). Como destacan los autores, el efecto anti-proliferativo de la UA fue notablemente mayor al de la UB, lo que refuerza la teoría propuesta por González-Sarrías y col, de que la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 8 de la UA es parcialmente responsable del aumento de su actividad biológica (González-Sarrías et al., 2014, 2017a).

A continuación decidimos evaluar si los efectos de las urolitinas observados sobre la proliferación celular se podían explicar mediante la modulación del ciclo celular. Para ello utilizamos la técnica de citometría de flujo, al igual que lo habíamos hecho al evaluar el efecto del AE.

A lo largo del ciclo celular, existen diferentes puntos de control cuyo objetivo es evitar la progresión del mismo si el ADN se encuentra dañado, proporcionando el tiempo necesario para su reparación y previniendo que alteraciones genéticas sean capaces de

propagarse a las generaciones posteriores (Zhou & Elledge, 2000). En caso de que los daños no fueran reparados, la célula permanece arrestada y su división no prosigue. Estos puntos de control se encuentran a lo largo de todo el ciclo celular, sin embargo posiblemente debido al escaso número de reportes en los que se observa un arresto del ciclo celular en la fase S, a menudo se ha pensado que los puntos de control de la misma tienen un papel menor en comparación con los puntos de control de las fases G1 y G2/M. Aunque si tenemos en cuenta la complejidad de los procesos involucrados en la replicación del ADN y los innumerables tipos de errores que pueden producirse, resulta lógico conjeturar que la fase S es posiblemente el período más vulnerable del ciclo de división celular. Es por eso que cuenta con tres puntos: control de replicación (asegura la disponibilidad de dNTPs necesarios para la replicación), control intra-S (asegura la integridad de la horquilla de replicación), y control S-M (asegura que la célula haya duplicado su genoma antes de entrar en la fase G2/M) (Bartek et al., 2004). A continuación se encuentra el punto de control al final de la fase G2, el cual alerta acerca de posibles daños del ADN. Ante la detección de cualquier irregularidad, la célula activa mecanismos que impiden su entrada en mitosis y como consecuencia queda arrestada en ese estadio ya sea para mantenerse allí o gatillar vías de muerte celular (Lagunas Cruz et al., 2014).

En el presente trabajo, analizamos la distribución celular en las distintas fases del ciclo celular luego del tratamiento por 24 h con la UA y la UB. Observamos un aumento significativo de la proporción de células en la fase S tanto para la línea St-T1b (tratadas con UA o con UB) como para la línea 12Z (tratadas con UA); y también un aumento de células en la fase G2/M para la línea 12Z (tratadas con UA o con UB). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Larrosa y col (2006) en células de cáncer de colon

Caco-2, donde se demostró que el AE provoca una disminución de las ciclinas A y B1, y una aumento de la ciclina E, lo que induce al arresto del ciclo celular en la fase S. También coinciden con lo reportado por Kasimsetty y col (2010) quienes observaron que el tratamiento de células HT-29 con UA o UB por 48 h induce el arresto del ciclo en las fases G2/M y S o en la fase G2/M respectivamente. Además, Gonzalez- Sarrías y col. (2014) concluyeron que el efecto anti-proliferativo ejercido por urolitinas sobre las líneas celulares Caco-2, SW480 y HT-29, es mediado por el arresto del ciclo en las fases S y G2/M (UA) o sólo en la fase S (UB, UC y UD). Asimismo, González- Sarrías y col. (2017) observaron que tanto la UA como su isoforma, en una concentraciones de 50 y 100 μ M, provocaron un aumento significativo del número de células Caco-2 en las fases G2/M y S luego de 24 y 48 h, acompañado de una disminución significativa de células en la fase G0/G1.

Además, son numerosos los reportes sobre diversos tipos celulares donde demuestran que las urolitinas provocan una detención del ciclo celular en la fase G2/M (Khan et al., 2009; Liu et al., 2017; Mele et al., 2016; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2018).

A partir de lo planteado en los párrafos anteriores, se desprende que dependiendo del compuesto natural y del tipo celular analizado, los cambios moleculares asociados al arresto del ciclo pueden diferir y que son múltiples las vías que pueden regular este proceso.

A fin de profundizar en los posibles mecanismos moduladores de la proliferación celular, es que procedimos con el análisis de la apoptosis. En los cultivos tratados con UA observamos un aumento significativo de células apoptóticas en las células St-T1b, pero no en las células 12Z. Por otro lado, el tratamiento con UB no demostró tener incidencia

sobre este proceso en ninguna de las líneas celulares. Resultados similares han sido obtenidos por Liberal y col. (2017). En dicho trabajo observaron que únicamente la UA indujo la apoptosis en las células de cáncer de vejiga UMUC3. Por el contrario, en esa misma investigación concluyeron que las urolitinas B y C no mostraron modulación alguna sobre los niveles de apoptosis o necrosis.

También, Vicinanza y col. (2013) han observado que *in vitro* el AE indujo apoptosis en dos líneas de células prostáticas DU 145 y PC-3; mientras que la UA sólo indujo apoptosis en DU-145 en menor proporción. Ellos concluyen que, incluso en líneas celulares derivadas del mismo tipo de tejido, pueden observarse diferencias en la expresión de proteínas, por lo tanto los resultados entre ellas pueden diferir. Es por eso que proponen que estas diferencias probablemente se deban a las variaciones genéticas y moleculares entre las líneas celulares estudiadas, tal como fue demostrado en otros estudios previos *in vitro* (Skjøth & Issinger, 2006).

Estos antecedentes nos llevaron a concluir que como la activación de la apoptosis puede darse a través de diversas vías, indudablemente las diferencias inherentes a cada línea podrían influir en su respuesta apoptótica frente al tratamiento con las urolitinas.

A continuación, tal y como procedimos con el AE, decidimos evaluar el efecto de las urolitinas sobre el comportamiento celular centrándonos en la adhesión, migración e invasión celular.

En concordancia con nuestros resultados obtenidos para AE, demostramos que la UB fue efectiva en la disminución del número de células adherentes para las líneas celulares 12Z y St-T1b, mientras que la UA no produjo ningún cambio significativo. Anteriormente, Mele y col. (2016) han reportado que tanto el AE por sí sólo, como una

combinación de UA + UB en concentraciones equimolares, reducen la adhesión de las células THP-1 (línea celular similar a la de los monocitos humanos) a células endoteliales de la vena umbilical (HUVECs). Esto es mediado por una menor secreción de la molécula de adhesión celular VCAM-1. En ese mismo sentido, resultados preliminares obtenidos por una integrante de nuestro grupo indicarían que la UA reduce la expresión génica de la cadherina CDH2 y el antígeno CD44 en la línea endometriósica 12Z.

Al evaluar la capacidad migratoria de las células tratadas con las urolitinas notamos que la UA únicamente logró disminuir la migración celular de las células St-T1b, mientras que la UB fue efectiva en ambas líneas celulares evaluadas. Respecto a la invasión celular, observamos que ambas urolitinas disminuyeron significativamente la capacidad invasiva de las células 12Z, que tal como mencionamos anteriormente, constituye un modelo consolidado para estudiar dicho proceso (Zeitvogel et al., 2001).

Estos últimos resultados concuerdan con los obtenidos por Zhao y col. (Zhao et al., 2018) quienes reportaron que la UA redujo la migración e invasión de las células cancerosas colorrectales SW620, y provocó una significativa disminución en la actividad de la MMP-9. Sin embargo, al día de hoy no existe información previa en la literatura acerca del efecto de las UA y UB sobre la adhesión, migración e invasión de células de origen endometrial o endometriósico, por lo que es la primera vez que se describen sus efectos sobre estos parámetros. A su vez, estos resultados reforzaron los obtenidos con el AE, ya que se observaron respuestas similares en cuanto a una disminución de la adhesión y la migración por parte de células epiteliales y estromales.

Previamente se ha reportado que el tejido endometrial de pacientes con EDT muestra alteraciones en los patrones de expresión de determinados genes relacionados con la aumentada capacidad proliferativa y adhesiva, y con el crecimiento invasivo; entre otros procesos (Bałkowiec et al., 2018; Chelariu-Raicu et al., 2016; Collette et al., 2004; Klemmt et al., 2007; Meresman et al., 2011; Ricci, 2012). Por lo tanto, y en vista de los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos evaluar el efecto de la UA y la UB sobre la expresión génica de cultivos primarios de células estromales de pacientes, y células de las líneas St-T1b y 12Z luego de 24 h de tratamiento. Los genes analizados fueron: las MMPs 2, 3 y 9, y su inhibidor TIMP-1 (asociados a la invasión celular); Rac1 y Rock2 (implicados en la migración); SDC1 (vinculado a la proliferación, migración y adhesión celular); y la integrina ITGAV (implicados en la adhesión celular). Para ello, se midieron sus niveles de expresión luego del correspondiente tratamiento.

En cuanto a las MMPs, el efecto más pronunciado se observó en la línea 12Z. El tratamiento con ambas urolitinas indujo una marcada disminución en la expresión de las MMP3 y MMP9, mientras que la UA además disminuyó la expresión de las MMP2. Estos datos podrían explicar, al menos parcialmente, por qué las células 12Z muestran una reducción en su capacidad invasiva en el ensayo de invasión, ya que las metaloproteasas intervienen en la degradación de las matrices extracelulares similares a la utilizada en el trans-well de matrigel. Coincidentemente, existen reportes en donde se demuestra que el AE inhibe el crecimiento invasivo de células de cáncer de ovario al disminuir los niveles de MMP2 y MMP9 (Liu et al., 2017).

Al analizar las células St-T1b, si bien no se observó un efecto estadísticamente significativo sobre la expresión de las MMPs, el tratamiento con UA produjo un incremento en la expresión del inhibidor TIMP-1.

Es importante destacar que los inhibidores TIMP se unen no covalentemente en forma estequiométrica (1:1) a las MMPs formando complejos reversibles que inhiben la acción de las mismas (Murphy, 2011); y que su unión no es igual de eficiente con todas ellas. En particular TIMP-1 inhibe preferentemente a la MMP9. Por lo tanto, no solo es importante analizar los niveles de cada componente por separado sino también su relación ya que la misma refleja el potencial proteolítico de la célula en cuestión (Brew & Nagase, 2010; Coronato et al., 2012; Jinga et al., 2006). Es por eso que consideramos que la sobreexpresión de TIMP-1 en relación con los niveles de MMP9 observada en la línea St-T1b tras 24 h de tratamiento con UA, es en parte responsable del efecto anti-invasivo de esta urolitina. Trabajos previos realizados en el laboratorio en el cual se realizaron estos ensayos demostraron como la regulación de TIMP-1, el cual se une no covalentemente tanto a las formas activas como a las pro-formas de las MMPs, está involucrada en la capacidad proteolítica de las células de cáncer de mama MCF-7 (Nikolova et al., 2009).

Con respecto a SDC1 observamos que la UA y la UB provocan una disminución de su expresión en las células 12Z. El grupo de Münster, pudo demostrar previamente que una reducción de este co-receptor de superficie celular en las células 12Z da lugar a una inhibición de la capacidad de invasión de la matriz y de la expresión de MMP9 (Schneider et al., 2013), lo cual está en línea con los efectos del tratamiento observados en esta tesis.

Conjuntamente, obtuvimos un efecto inhibitorio sobre la expresión de Rho GTPasa Rac1 y ROCK2, dos factores involucrados en la regulación del citoesqueleto y la motilidad celular en las células 12Z tratadas con UA y UB. Si bien hasta el momento no se ha descrito la influencia de las urolitinas sobre ellos, es relevante mencionar que el

extracto de granada inhibe la motilidad y la invasión de células cáncer de mama mediante la regulación de otros miembros de la familia de las Rho GTPasas: RhoA y RhoC (Khan et al., 2009). Lo cual nos lleva a creer que mecanismos similares podrían estar activos en nuestros ensayos. De hecho, la disminución en los niveles de ROCK2 tras el tratamiento con la UA podría ser uno de los factores involucrados en la reducción aunque no estadísticamente significativa de la migración observada en las células 12Z; mientras que la disminución en la expresión tanto de Rac1 como de ROCK2 podría haber contribuido a la reducción su capacidad de invasión.

En cuanto a los niveles de la integrina ITGAV y el proteoglicano de superficie SDC1 de las células 12Z obtuvimos una reducción en su expresión ante el tratamiento con UA y UB. Las integrinas son moléculas implicadas en los procesos de adhesión y migración celular (Theocharis et al., 2016), y como se ha demostrado previamente la desregulación inducida por microRNA del ITGAV contribuye a una inhibición de la invasión *in vitro* de células (Schwickert et al., 2015). Asimismo, anteriormente se ha demostrado que la inhibición de los receptores de prostaglandina impiden la adhesión de células endometriósicas humanas a través de la supresión de los mecanismos mediados por integrinas (Lee et al., 2013), lo que estaría en línea con nuestro hallazgo de una reducción tanto de la expresión del ITGAV como de la adhesión celular de las células 12Z tratadas con UB.

En general, los cambios inducidos por las urolitinas en la expresión génica se encuentran en concordancia con los cambios observados en el comportamiento de las células 12Z, proveyendo una posible contribución mecanicista para la explicación de los procesos evaluados. Sin embargo, no ocurre lo mismo al evaluar las St-T1b, lo que nos

lleva a concluir que posiblemente sean otros los mecanismos involucrados en los procesos estudiados.

Tal y como procedimos con el AE, y habiendo obtenido resultados sumamente interesantes con UA y UB sobre los modelos experimentales *in vitro*, nuestro último desafío fue complementar el estudio evaluando su efecto en el modelo de EDT *in vivo* ya utilizado. La única diferencia en el protocolo experimental fue la vía de administración del tratamiento, la cual en este caso fue a través de inyecciones i.p. diarias.

Como ya fue discutido durante esta tesis, la variabilidad inter-individuo en la producción de urolitinas es un tema bien establecido (Barberán et al., 2017). De allí que, a fin de reducir dicha diferencia entre animales, durante este último ensayo *in vivo* las urolitinas se administraron vía i.p. tal como se había reportado anteriormente en modelos *in vivo* de diabetes (Savi et al., 2017). De este modo, logramos analizar el efecto a nivel local y alcanzar mayores concentraciones de las urolitinas.

Con los mismos interrogantes que nos condujeron en el estudio del AE, en primer lugar nos resultó importante evaluar el efecto de la UA y la UB sobre el comportamiento de los animales y la progresión de su ciclo estral. A partir de los resultados obtenidos corroboramos que el tratamiento no interfirió en ninguno de estos aspectos. A su vez, a partir de la observación de cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina logramos reconocer las estructuras típicas de ovarios y útero, lo que nos llevó a concluir que en rasgos generales el tratamiento no afecta dichos órganos. Sin embargo, es necesario realizar ensayos más específicos para determinar el efecto del tratamiento sobre la reserva ovárica y otros factores que resultan de gran interés para la enfermedad.

Nuestros resultados demostraron que tanto la UA como la UB inhiben significativamente el desarrollo de las lesiones endometriósicas inducidas quirúrgicamente reduciendo significativamente el número de lesiones encontradas luego de 4 semanas de tratamiento. Especialmente el grupo tratado con UA presentó una única lesión desarrollada, lo cual sin duda correspondió a un dato atípico.

Por otro lado, el tratamiento con UB también indujo una disminución significativa del tamaño de las lesiones a través de un aumento en la apoptosis (Figura 2.11) y una disminución en la proliferación (Figura 2.10) de las células estromales y epiteliales que conforman las lesiones.

De acuerdo con la bibliografía, este es el primer antecedente que demuestra la efectividad de la UA y la UB en un modelo murino de EDT en ratones BALB/c.

Como se pudo observar en los reportes citados durante esta parte de la discusión, hoy en día hay cada vez más pruebas de que las terapias naturales mejoran el tratamiento de diferentes enfermedades. En particular, en los últimos años, una serie de investigaciones *in vitro* e *in vivo* han demostrado la versatilidad de actividades biológicas por parte de las urolitinas.

De acuerdo con varios informes (González-Sarrías et al., 2009, 2014; Kasimsetty et al., 2010; Stolarczyk et al., 2013), nuestros resultados sugieren que la UA y la UB ejercen diferentes efectos *in vitro* dependiendo de la línea celular. Conjuntamente, los efectos observados en el modelo *in vivo* de EDT resultan prometedores y refuerzan la idea de continuar estudiándolos como posible tratamiento de la enfermedad, lo cual está en concordancia con la intensa búsqueda de terapias alternativas y naturales de los últimos tiempos (Ferella et al., 2018; Ricci et al., 2013; Wieser et al., 2007).

CONCLUSIONES

Los ensayos realizados durante la presente tesis doctoral se enmarcan en uno de los ejes principales de investigación impulsados por nuestro laboratorio: la búsqueda de alternativas terapéuticas de origen natural que minimicen los efectos adversos, contribuya a una mejor calidad de vida de las pacientes al contemplar sus necesidades y proyectos personales, que sean económicamente más accesibles y puedan ser producidos en el país.

Según la bibliografía disponible hasta el momento, este trabajo es pionero en la utilización del AE y las urolitinas UA y UB sobre modelos de EDT *in vitro* e *in vivo*.

No debemos perder de vista que el desarrollo de nuevas terapias, sin importar cuál sea la patología a tratar, involucra necesariamente estudios exhaustivos para determinar las concentraciones plasmáticas efectivas y los posibles efectos sistémicos de las mismas. Más aún, al tratarse de formulaciones de origen natural, debe además estandarizarse la purificación del compuesto bioactivo y controlar su calidad, lo cual requiere un compromiso interdisciplinario. Es por eso que resulta imperioso que los organismos estatales fomenten a través de inversiones las diferentes áreas del conocimiento involucradas. Esto incluye la Biología y la Agronomía, la investigación tecnológica con énfasis en la Química y las Ciencias Farmacéuticas y Médicas (Cañigüeral et al., 2003), y la necesaria capacitación de los especialistas de salud quienes tienen contacto directo con las pacientes.

En base a los antecedentes expuestos y teniendo en cuenta las consideraciones discutidas, creemos que los resultados obtenidos en este trabajo son promisorios y avalan continuar investigando al AE y sus metabolitos como posibles estrategias de tratamiento de la EDT.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu Hashim, H. (2012). Gonadotrophin-releasing hormone analogues and endometriosis: current strategies and new insights. *Gynecological Endocrinology : The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 28(4), 314–321. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.650751>
- Acién, P., & Velasco, I. (2013). Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2013, 242149. <https://doi.org/10.1155/2013/242149>
- Adammek, M., Greve, B., Kässens, N., Schneider, C., Brüggemann, K., Schüring, A. N., ... Götte, M. (2013). MicroRNA miR-145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1346-1355.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.055>
- Adams, L. S., Zhang, Y., Seeram, N. P., Heber, D., & Chen, S. (2010). Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(1), 108–113. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0225>
- Adamson, G. D., Kennedy, S., & Hummelshoj, L. (2010). Creating Solutions in Endometriosis: Global Collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. *Journal of Endometriosis*, 2(1), 3–6. <https://doi.org/10.1177/228402651000200102>
- Ahn, S. H., Khalaj, K., Young, S. L., Lessey, B. A., Koti, M., & Tayade, C. (2016). Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. *Fertility and Sterility*, 106(6), 1420-1431.e7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.005>
- Aiyer, H. S., & Gupta, R. C. (2010). Berries and ellagic acid prevent estrogen-induced mammary tumorigenesis by modulating enzymes of estrogen metabolism. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(6), 727–737. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0260>
- Aiyer, H., Srinivasan, C., & Gupta, R. (2008). Dietary Berries and Ellagic Acid Diminish Estrogen-Mediated Mammary Tumorigenesis ∈ ACI rats. *Nutrition and Cancer*, 60(2), 227–234. <https://doi.org/10.1080/01635580701624712>

- ASRM. (1997). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and Sterility*, 67(5), 817–821. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)81391-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)81391-x)
- Bałkowiec, M., Maksym, R. B., & Włodarski, P. K. (2018). The bimodal role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in etiology and pathogenesis of endometriosis (Review). *Molecular Medicine Reports*, 18(3), 3123–3136. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9303>
- Baraño, R. I. (2014). [Endometriosis. Why is not removed by the immune system?]. *Ginecología y Obstetricia de Mexico*, 82(11), 755–763. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826957>
- Barra, F., Scala, C., Mais, V., Guerriero, S., & Ferrero, S. (2018). Investigational drugs for the treatment of endometriosis, an update on recent developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(5), 445–458. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1471135>
- Benagiano, G., Brosens, I., & Lippi, D. (2014). The history of endometriosis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 78(1), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000358919>
- Bialonska, D., Kasimsetty, S. G., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2009). Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10181–10186. <https://doi.org/10.1021/jf9025794>
- Bilotas, M. A., Olivares, C. N., Ricci, A. G., Baston, J. I., Bengochea, T. S., Meresman, G. F., & Baraño, R. I. (2015). Interplay between Endometriosis and Pregnancy in a Mouse Model. *PLOS ONE*, 10(4), e0124900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124900>
- Bilotas, M., Baraño, R. I., Buquet, R., Sueldo, C., Tesone, M., & Meresman, G. (2007). 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. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(3), 644–653. <https://doi.org/10.1093/humrep/del423>
- Bilotas, M., Meresman, G., Buquet, R., Sueldo, C., & Baraño, R. I. (2010). Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 β on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Journal of Reproductive Immunology*, 84(2), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.12.002>

- Bilotas, M., Meresman, G., Stella, I., Sueldo, C., & Barañao, R. I. (2010). Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2513–2518. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.08.058>
- Bina, F., Soleymani, S., Toliat, T., Hajimahmoodi, M., Tabarrai, M., Abdollahi, M., & Rahimi, R. (2019). Plant-derived medicines for treatment of endometriosis: A comprehensive review of molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, 139, 76–90. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.008>
- Brew, K., & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 55–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>
- Brodie, A., Jelovac, D., & Long, B. J. (2003). Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(1 Pt 2), 455S–9S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538500>
- Brosens, J. J., Takeda, S., Acevedo, C. H., Lewis, M. P., Kirby, P. L., Symes, E. K., ... White, J. O. (1996). Human endometrial fibroblasts immortalized by simian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stimulus. *Endocrinology*, 137(6), 2225–2231. <https://doi.org/10.1210/endo.137.6.8641169>
- Brown, J., Crawford, T. J., Allen, C., Hopewell, S., & Prentice, A. (2017). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD004753. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004753.pub4>
- Brown, J., & Farquhar, C. (2015). An overview of treatments for endometriosis. *JAMA*, 313(3), 296–297. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.17119>
- Brown, J., Kives, S., & Akhtar, M. (2012). Progestagens and anti-progestagens for pain associated with endometriosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), CD002122. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002122.pub2>
- Bulletti, C., Coccia, M. E., Battistoni, S., & Borini, A. (2010). Endometriosis and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(8), 441–447. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9436-1>

- Bulun, S. E. (2009). Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, 360(3), 268–279. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804690>
- Bulun, S. E., Gurates, B., Fang, Z., Tamura, M., Sebastian, S., Zhou, J., ... Yang, S. (2002). Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology*, 55(1–2), 21–33. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00132-2](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00132-2)
- Burla, L., Scheiner, D., Samartzis, E. P., Seidel, S., Eberhard, M., Fink, D., ... Imesch, P. (2019). The ENZIAN score as a preoperative MRI-based classification instrument for deep infiltrating endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 300(1), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05157-1>
- Burney, R. O., & Giudice, L. C. (2012). Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(3), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>
- Burns, K. A., Rodriguez, K. F., Hewitt, S. C., Janardhan, K. S., Young, S. L., & Korach, K. S. (2012). Role of Estrogen Receptor Signaling Required for Endometriosis-Like Lesion Establishment in a Mouse Model. *Endocrinology*, 153(8), 3960–3971. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1294>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE*, 7(4), e35538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Cañigüeral, S., Dellacasa, E., & Baldoni, A. (2003). Plantas medicinales y Fitoterapia: ¿indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Famr. Bonaerense*, 3, 265–278.
- Cao, X., Yang, D., Song, M., Murphy, A., & Parthasarathy, S. (2004). The presence of endometrial cells in the peritoneal cavity enhances monocyte recruitment and induces inflammatory cytokines in mice: implications for endometriosis. *Fertility and Sterility*, 82 Suppl 3, 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.040>
- Ceci, C., Lacal, P. M., Tentori, L., De Martino, M. G., Miano, R., & Graziani, G. (2018). Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. *Nutrients*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/nu10111756>
- Cerdá, B., Espín, J. C., Parra, S., Martínez, P., & Tomás-Barberán, F. A. (2004). The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of

- healthy humans. *European Journal of Nutrition*, 43(4), 205–220. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0461-7>
- Cerdá, B., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2005). Metabolism of Antioxidant and Chemopreventive Ellagitannins from Strawberries, Raspberries, Walnuts, and Oak-Aged Wine in Humans: Identification of Biomarkers and Individual Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 227–235. <https://doi.org/10.1021/jf049144d>
- Chan, R. W. S., Ng, E. H. Y., & Yeung, W. S. B. (2011). Identification of Cells with Colony-Forming Activity, Self-Renewal Capacity, and Multipotency in Ovarian Endometriosis. *The American Journal of Pathology*, 178(6), 2832–2844. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.025>
- Chang, S. P., & Ng, H. T. (1996). A randomized comparative study of the effect of leuprorelin acetate depot and danazol in the treatment of endometriosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi = Chinese Medical Journal; Free China Ed*, 57(6), 431–437. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8803306>
- Chapron, C., Fauconnier, A., Vieira, M., Barakat, H., Dousset, B., Pansini, V., Vacher-Lavenu, M.C., Dubuisson, J. B. (2003). Anatomical distribution of deeply infiltrating endometriosis: surgical implications and proposition for a classification. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(1), 157–161. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg009>
- Chapron, C., Marcellin, L., Borghese, B., & Santulli, P. (2019). Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(11), 666–682. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0245-z>
- Chelariu-Raicu, A., Wilke, C., Brand, M., Starzinski-Powitz, A., Kiesel, L., Schüring, A. N., & Götte, M. (2016). Syndecan-4 expression is upregulated in endometriosis and contributes to an invasive phenotype. *Fertility and Sterility*, 106(2), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.03.032>
- Chen, Q.-H., Zhou, W.-D., Su, Z.-Y., Huang, Q.-S., Jiang, J.-N., & Chen, Q.-X. (2010). Change of proinflammatory cytokines follows certain patterns after induction of endometriosis in a mouse model. *Fertility and Sterility*, 93(5), 1448–1454. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.013>
- Chen, Y., Peng, W., Lu, Y., Chen, J., Zhu, Y. Y., & Xi, T. (2013). MiR-200a enhances the migrations of A549 and SK-MES-1 cells by regulating the expression of TSPAN1. *Journal of Biosciences*,

- 38(3), 523–532. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9351-6>
- Child, T. J., & Tan, S. L. (2001). Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs*, 61(12), 1735–1750. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161120-00005>
- Chinembiri, T. N., du Plessis, L. H., Gerber, M., Hamman, J. H., & du Plessis, J. (2014). Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), 11679–11721. <https://doi.org/10.3390/molecules190811679>
- Collette, T., Bellehumeur, C., Kats, R., Maheux, R., Mailloux, J., Villeneuve, M., & Akoum, A. (2004). Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(6), 1257–1264. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh290>
- Cousins, F. L., O, D. F., & Gargett, C. E. (2018). Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 50, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.01.011>
- D'Hooghe, T M, Bambra, C. S., De Jonge, I., Lauweryns, J. M., & Koninckx, P. R. (1996a). The prevalence of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*) increases with the duration of captivity. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 75(2), 98–101. <https://doi.org/10.3109/00016349609033298>
- D'Hooghe, T M, Bambra, C. S., Raeymaekers, B. M., & Koninckx, P. R. (1996b). Increased prevalence and recurrence of retrograde menstruation in baboons with spontaneous endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 11(9), 2022–2025. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019537>
- D'Hooghe, Thomas M, Debrock, S., Hill, J. A., & Meuleman, C. (2003). Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Seminars in Reproductive Medicine*, 21(2), 243–254. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41330>
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>

- Dellafiora, L., Mena, P., Cozzini, P., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2013). Modelling the possible bioactivity of ellagitannin-derived metabolites. In silico tools to evaluate their potential xenoestrogenic behavior. *Food & Function*, 4(10), 1442. <https://doi.org/10.1039/c3fo60117j>
- Dodds, K. N., Beckett, E. A. H., Evans, S. F., & Hutchinson, M. R. (2017). Lesion development is modulated by the natural estrous cycle and mouse strain in a minimally invasive model of endometriosis†. *Biology of Reproduction*, 97(6), 810–821. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox132>
- Dunkel, M., Fullbeck, M., Neumann, S., & Preissner, R. (2006). SuperNatural: a searchable database of available natural compounds. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), D678–83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj132>
- Dunselman, G. A., Hendrix, M. G., Bouckaert, P. X., & Evers, J. L. (1988). Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(2), 707–710. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820707>
- Ebert, A. D., Fuhr, N., David, M., Schnepfel, L., & Papadopoulos, T. (2009). Histological confirmation of endometriosis in a 9-year-old girl suffering from unexplained cyclic pelvic pain since her eighth year of life. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 67(3), 158–161. <https://doi.org/10.1159/000181185>
- Eggermont, J., Donnez, J., Casanas-Roux, F., Scholtes, H., & Van Langendonck, A. (2005). Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertility and Sterility*, 84(2), 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.034>
- Eggers, J. C., Martino, V., Reinbold, R., Schäfer, S. D., Kiesel, L., Starzinski-Powitz, A., ... Götte, M. (2016). MicroRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometriotic cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4. *Reproductive BioMedicine Online*, 32(4), 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.12.013>
- Emera, D., Romero, R., & Wagner, G. (2012). The evolution of menstruation: a new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 34(1), 26–35. <https://doi.org/10.1002/bies.201100099>
- Ernst, E. (2000). The role of complementary and alternative medicine. *BMJ (Clinical Research*

- Ed.), 321(7269), 1133–1135. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7269.1133>
- Eskenazi, B., & Warner, M. L. (1997). Epidemiology of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 24(2), 235–258. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163765>
- Espín, J. C., González-Barrio, R., Cerdá, B., López-Bote, C., Rey, A. I., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10476–10485. <https://doi.org/10.1021/jf0723864>
- Espín, J. C., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. (2013). Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/270418>
- Fassbender, A., Rahmioglu, N., Vitonis, A. F., Viganò, P., Giudice, L. C., D'Hooghe, T. M., ... Zondervan, K. T. (2014). World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: IV. Tissue collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertility and Sterility*, 102(5), 1244–1253. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.1209>
- Ferella, L., Bastón, J. I., Bilotas, M. A., Singla, J. J., González, A. M., Olivares, C. N., & Meresman, G. F. (2018). Active compounds present in *Rosmarinus officinalis* leaves and *Scutellaria baicalensis* root evaluated as new therapeutic agents for endometriosis. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(6), 769–782. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.09.018>
- Ferreira, J. G., Diniz, P. M. M., Andrade de Paula, C. A., Lobo, Y. A., Paredes-Gamero, E. J., Paschoalin, T., ... Oliva, M. L. V. (2013). The impaired viability of prostate cancer cell lines by the recombinant plant kallikrein inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13641–13654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404053>
- Ferrero, S., Barra, F., & Leone Roberti Maggiore, U. (2018). Current and Emerging Therapeutics for the Management of Endometriosis. *Drugs*, 78(10), 995–1012. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0928-0>
- Flower, A., Liu, J. P., Lewith, G., Little, P., & Li, Q. (2012). Chinese herbal medicine for endometriosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5), CD006568.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD006568.pub3>

- Fraser, I. S., Shearman, R. P., Jansen, R. P., & Sutherland, P. D. (1991). A comparative treatment trial of endometriosis using the gonadotrophin-releasing hormone agonist, nafarelin, and the synthetic steroid, danazol. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *31*(2), 158–163. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828x.1991.tb01807.x>
- Garcia-Velasco, J. A., Mulayim, N., Kayisli, U. A., & Arici, A. (2002). Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, *78*(4), 855–859. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03320-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03320-4)
- Gazvani, R., & Templeton, A. (2002). New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, *76*(2), 117–126. [https://doi.org/10.1016/s0020-7292\(01\)00577-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7292(01)00577-x)
- Gazvani, Rafet, & Templeton, A. (2002). Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction (Cambridge, England)*, *123*(2), 217–226. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866688>
- Ghai, V., Jan, H., Shakir, F., Haines, P., & Kent, A. (2019). Diagnostic delay for superficial and deep endometriosis in the United Kingdom. *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1603217>
- Giménez-Bastida, J. A., Truchado, P., Larrosa, M., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., Allende, A., & García-Conesa, M. T. (2012). Urolithins, ellagitannin metabolites produced by colon microbiota, inhibit Quorum Sensing in *Yersinia enterocolitica*: Phenotypic response and associated molecular changes. *Food Chemistry*, *132*(3), 1465–1474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.003>
- Giudice, L. C. (2010). Clinical practice. Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, *362*(25), 2389–2398. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1000274>
- Giudice, L. C., & Kao, L. C. (2004). Endometriosis. *The Lancet*, *364*(9447), 1789–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17403-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17403-5)
- González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. Á., Tomé-Carneiro, J., Zafrilla, P.,

- Mulero, J., ... Espín, J. C. (2015). Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *Journal of Functional Foods*, *19*, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.019>
- González-Sarrías, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A., Dolara, P., & Espín, J. C. (2010). NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *British Journal of Nutrition*, *104*(4), 503–512. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000826>
- González-Sarrías, A., Núñez-Sánchez, M. Á., Tomé-Carneiro, J., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T., & Espín, J. C. (2016). Comprehensive characterization of the effects of ellagic acid and urolithins on colorectal cancer and key-associated molecular hallmarks: MicroRNA cell specific induction of CDKN1A (p21) as a common mechanism involved. *Molecular Nutrition and Food Research*, *60*(4), 701–716. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500780>
- Götte, M., Spillmann, D., Yip, G. W., Versteeg, E., Echtermeyer, F. G., Van kuppevelt, T. H., & Kiesel, L. (2008). Changes in heparan sulfate are associated with delayed wound repair, altered cell migration, adhesion and contractility in the galactosyltransferase I (β 4GalT-7) deficient form of Ehlers-Danlos syndrome. *Human Molecular Genetics*, *17*(7), 996–1009. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm372>
- Gramec Skledar, D., Tomašič, T., Sollner Dolenc, M., Peterlin Mašič, L., & Zega, A. (2019). Evaluation of endocrine activities of ellagic acid and urolithins using reporter gene assays. *Chemosphere*, *220*, 706–713. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.185>
- Grangier, L., Aerts, L., & Pluchino, N. (2019). [Clinical investigation of Sexual pain in patients with endometriosis]. *Revue Medicale Suisse*, *15*(668), 1941–1944. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643155>
- Greene, R., Stratton, P., Cleary, S. D., Ballweg, M. Lou, & Sinaii, N. (2009). Diagnostic experience among 4,334 women reporting surgically diagnosed endometriosis. *Fertility and Sterility*, *91*(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.020>
- Greve, B., Dreffke, K., Rickinger, A., Könemann, S., Fritz, E., Eckardt-Schupp, F., ... Bölling, T. (2009). Multicentric investigation of ionising radiation-induced cell death as a predictive parameter of individual radiosensitivity. *Apoptosis*, *14*(2), 226–235. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0294-6>

- Guo, S.-W. (2009). Recurrence of endometriosis and its control. *Human Reproduction Update*, 15(4), 441–461. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp007>
- Guo, S.-W., & Wang, Y. (2006). Sources of heterogeneities in estimating the prevalence of endometriosis in infertile and previously fertile women. *Fertility and Sterility*, 86(6), 1584–1595. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.04.040>
- Haas, D., Oppelt, P., Shebl, O., Shamiyeh, A., Schimetta, W., & Mayer, R. (2013). Enzian classification: does it correlate with clinical symptoms and the rASRM score? *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 92(5), 562–566. <https://doi.org/10.1111/aogs.12118>
- Halis, G., & Arici, A. (2004). Endometriosis and inflammation in infertility. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034, 300–315. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.032>
- Halme, J., Hammond, M. G., Hulka, J. F., Raj, S. G., & Talbert, L. M. (1984). Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics and Gynecology*, 64(2), 151–154. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6234483>
- Halme, J., & Surrey, E. S. (1990). Endometriosis and infertility: the mechanisms involved. *Progress in Clinical and Biological Research*, 323, 157–178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406745>
- Han, S. J., Jung, S. Y., Wu, S.-P., Hawkins, S. M., Park, M. J., Kyo, S., ... O'Malley, B. W. (2015). Estrogen Receptor β Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. *Cell*, 163(4), 960–974. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.034>
- Huang, W., Zhang, H., Liu, W., & Li, C. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 13(2), 94–102. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100137>
- Izumi, G., Koga, K., Takamura, M., Makabe, T., Satake, E., Takeuchi, A., ... Osuga, Y. (2018). Involvement of immune cells in the pathogenesis of endometriosis. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 44(2), 191–198. <https://doi.org/10.1111/jog.13559>
- Jenkins, S., Olive, D. L., & Haney, A. F. (1986). Endometriosis: pathogenetic implications of the

- anatomic distribution. *Obstetrics and Gynecology*, 67(3), 335–338. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3945444>
- Jensen, J. R., & Coddington, C. C. (2010). Evolving spectrum: the pathogenesis of endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 53(2), 379–388. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3181db7b84>
- Jia, S.-Z., Leng, J.-H., Shi, J.-H., Sun, P.-R., & Lang, J.-H. (2012). Health-related quality of life in women with endometriosis: a systematic review. *Journal of Ovarian Research*, 5(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-29>
- Johnson, N. P., Hummelshoj, L., Adamson, G. D., Keckstein, J., Taylor, H. S., Abrao, M. S., ... Giudice, L. C. (2017). World endometriosis society consensus on the classification of endometriosis. *Human Reproduction*, 32(2), 315–324. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew293>
- Kallio, T., Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P., & Virtanen, V. (2013). Urolithins display both antioxidant and pro-oxidant activities depending on assay system and conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10720–10729. <https://doi.org/10.1021/jf403208d>
- Kang, I., Buckner, T., Shay, N. F., Gu, L., & Chung, S. (2016). Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 7(5), 961–972. <https://doi.org/10.3945/an.116.012575>
- Kao, A.-P., Wang, K.-H., Chang, C.-C., Lee, J.-N., Long, C.-Y., Chen, H.-S., ... Tsai, E.-M. (2011). Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1308-15.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.064>
- Kasimsetty, S. G., Bialonska, D., Reddy, M. K., Ma, G., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2010). Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2180–2187. <https://doi.org/10.1021/jf903762h>
- Kawabata, K., Yoshioka, Y., & Terao, J. (2019). Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules*, 24(2), 370. <https://doi.org/10.3390/molecules24020370>

- Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., ... ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. (2005). ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(10), 2698–2704. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei135>
- Kiesel, L., & Sourouni, M. (2019). Diagnosis of endometriosis in the 21st century. *Climacteric : The Journal of the International Menopause Society*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1080/13697137.2019.1578743>
- Kiss, A. K., & Piwowarski, J. P. (2019). Ellagitannins, Gallotannins and their Metabolites- The Contribution to the Anti-Inflammatory Effect of Food Products and Medicinal Plants. *Current Medicinal Chemistry*, 25(37), 4946–4967. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160919111559>
- Kitawaki, J., Kado, N., Ishihara, H., Koshiba, H., Kitaoka, Y., & Honjo, H. (2002). Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83(1–5), 149–155. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(02\)00260-1](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(02)00260-1)
- Knudtson, J. (2016). Endocrinología reproductiva femenina.
- Krikun, G., Mor, G., Alvero, A., Guller, S., Schatz, F., Sapi, E., ... Lockwood, C. J. (2004). A Novel Immortalized Human Endometrial Stromal Cell Line with Normal Progestational Response. *Endocrinology*, 145(5), 2291–2296. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1606>
- Kuyken, W., Orley, J., Sartorius, N., Power, M., Herrman, H., Schofield, H., & Murphy, M. (1995). The World Health Organization Quality of Life assessment (WHOQOL): position paper from the World Health Organization. *Social Science & Medicine (1982)*, 41(10), 1403–1409. [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(95\)00112-k](https://doi.org/10.1016/0277-9536(95)00112-k)
- Kyama, C. M., Mihalyi, A., Gevaert, O., Waelkens, E., Simsa, P., Van de Plas, R., Meuleman, C., De Moor, B., D'Hooghe, T. M. (2011). Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1338-43.e1-3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.084>
- Kyama, C. M., Overbergh, L., Debrock, S., Valckx, D., Vander Perre, S., Meuleman, C., ... D'Hooghe, T. M. (2006). Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 85(6), 1667–1675. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.11.060>

- Kyama, C. M., Overbergh, L., Mihalyi, A., Meuleman, C., Mwenda, J. M., Mathieu, C., & D'Hooghe, T. M. (2008). Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, *89*(2), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.057>
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, *44*(5), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2006a). Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(5), 1611–1620. <https://doi.org/10.1021/jf0527403>
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2006b). Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(5), 1611–1620. <https://doi.org/10.1021/jf0527403>
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., Yáñez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., ... Espín, J. C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(8), 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.04.012>
- Lee, G., Park, J.-S., Lee, E.-J., Ahn, J.-H., & Kim, H.-S. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of urolithin B in activated microglia. *Phytomedicine*, *55*, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.032>
- Lee, J., Banu, S. K., Burghardt, R. C., Starzinski-Powitz, A., & Arosh, J. A. (2013). Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits adhesion of human endometriotic epithelial and stromal cells through suppression of integrin-mediated mechanisms. *Biology of Reproduction*, *88*(3), 77. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100883>
- Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Sawin, S. W., Buck, C. A., Schinnar, R., Bilker, W., & Strom, B. L. (1994a). Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis.

- The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 79(2), 643–649.
<https://doi.org/10.1210/jcem.79.2.7519194>
- Liberal, J., Carmo, A., Gomes, C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2017). Urolithins impair cell proliferation, arrest the cell cycle and induce apoptosis in UMUC3 bladder cancer cells. *Investigational New Drugs*, 35(6), 671–681. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0483-7>
- Lin, Y.-H., Chen, Y.-H., Chang, H.-Y., Au, H.-K., Tzeng, C.-R., & Huang, Y.-H. (2018). Chronic Niche Inflammation in Endometriosis-Associated Infertility: Current Understanding and Future Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082385>
- Liu, H., Zeng, Z., Wang, S., Li, T., Mastriani, E., Li, Q. H., ... Liu, S. L. (2017). Main components of pomegranate, ellagic acid and luteolin, inhibit metastasis of ovarian cancer by down-regulating MMP2 and MMP9. *Cancer Biology and Therapy*, 18(12), 990–999. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1394542>
- Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S–3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- Longo, L. D. (1979). Classic pages in obstetrics and gynecology. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: William Wood Russell Johns Hopkins Hospital Bulletin, vol. 10, pp. 8--10, 1899. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 134(2), 225–226. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/377966>
- Lossoa, J. N., Bansode, R. R., Trappey, A., Bawadi, H. A., & Truax, R. (2004). In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J Nutr Biochem*, 15(11), 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.06.004>
- Ludwig, I. A., Mena, P., Calani, L., Borges, G., Pereira-Caro, G., Bresciani, L., ... Crozier, A. (2015). New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 758–769. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.400>
- Mabrouk, M., Elmakky, A., Caramelli, E., Farina, A., Mignemi, G., Venturoli, S., ... Seracchioli, R. (2012). Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(5), 1307–1312.

<https://doi.org/10.1007/s00404-011-2122-4>

- Madanes, D., Bilotas, M. A., Bastón, J. I., Singla, J. J., Meresman, G. F., Barañao, R. I., & Ricci, A. G. (2019). PI3K/AKT pathway is altered in the endometriosis patient's endometrium and presents differences according to severity stage. *Gynecological Endocrinology*, 1–5. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1680627>
- Manero, M. G., Royo, P., Olartecoechea, B., & Alcázar, J. L. (2009). Endometriosis in a postmenopausal woman without previous hormonal therapy: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 3, 135. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-3-135>
- Marinho, M. C. P., Magalhaes, T. F., Fernandes, L. F. C., Augusto, K. L., Brilhante, A. V. M., & Bezerra, L. R. P. S. (2018). Quality of Life in Women with Endometriosis: An Integrative Review. *Journal of Women's Health (2002)*, 27(3), 399–408. <https://doi.org/10.1089/jwh.2017.6397>
- Maruyama, T., Masuda, H., Ono, M., Kajitani, T., & Yoshimura, Y. (2010). Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(1), 11–22. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0438>
- Masuda, H., Matsuzaki, Y., Hiratsu, E., Ono, M., Nagashima, T., Kajitani, T., ... Okano, H. (2010). Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PloS One*, 5(4), e10387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010387>
- Mehriardestani, M., Aliahmadi, A., Toliat, T., & Rahimi, R. (2017). Medicinal plants and their isolated compounds showing anti-Trichomonas vaginalis- activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 88, 885–893. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.149>
- Mele, L., Mena, P., Piemontese, A., Marino, V., López-Gutiérrez, N., Bernini, F., ... Del Rio, D. (2016). Antiatherogenic effects of ellagic acid and urolithins in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 599, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.017>
- Meresman, G., Abello, V., Barañao, R. I., Auge, L., Tesone, M., & Sueldo, C. (2005a). Desogestrel Suppresses Cell Proliferation and Enhances Apoptosis of Eutopic Endometrial Tissue From Patients With Endometriosis. *Fertility and Sterility*, 84, S190. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.475>

- Meresman, G.F., Buquet, R. A., Bilotas, M., Barañao, R. I., Sueldo, C., & Tesone, M. (2002b). Gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis (EDT). *Fertility and Sterility*, 77, S43. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)03150-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03150-8)
- Meresman, G F, Vighi, S., Buquet, R. A., Contreras-Ortiz, O., Tesone, M., & Rumi, L. S. (2000). Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 74(4), 760–766. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01522-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01522-3)
- Meresman, Gabriela, Bilotas, M. A., Olivares, C. N., Ricci, A. G., Baston, J. I., & Barañao, R. I. (2011). 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. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 635–638.
- Meresman, Gabriela F, Augé, L., Barañao, R. I., Lombardi, E., Tesone, M., & Sueldo, C. (2002c). Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 77(6), 1141–1147. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03099-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03099-6)
- Meresman, Gabriela F, Bilotas, M., Abello, V., Buquet, R., Tesone, M., & Sueldo, C. (2005b). Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 84(2), 459–463. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.01.137>
- Meresman, Gabriela F, Bilotas, M., Buquet, R. A., Barañao, R. I., Sueldo, C., & Tesone, M. (2003). Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 80 Suppl 2, 702–707. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(03\)00769-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00769-6)
- Meresman, Gabriela F, Bilotas, M., Lombardi, E., Tesone, M., Sueldo, C. E., & Baranao, R. I. (2002a). Effect of gonadotropin-releasing hormone analogs on the apoptosis and release of IL-1 and VEGF in endometrial cultures from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 78, S202–S203. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04082-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04082-7)
- Mertens-Talcott, S. U., Jilma-Stohlawetz, P., Rios, J., Hingorani, L., & Derendorf, H. (2006). Absorption, Metabolism, and Antioxidant Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Polyphenols after Ingestion of a Standardized Extract in Healthy Human Volunteers. *Journal*

- of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8956–8961.
<https://doi.org/10.1021/jf061674h>
- Meyer, R. (1919). Ueber den stand der frage of adenomyositis und adenomyoma in algemeinen und insbesondere ueber adenomyositis seroepithelialis und adenomyometritis sarcomatosa (in german). *Zel Gynaecol*, 43, 745–750.
- Mier-Cabrera, J., Jiménez-Zamudio, L., García-Latorre, E., Cruz-Orozco, O., & Hernández-Guerrero, C. (2011). Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 118(1), 6–16.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02777.x>
- Mihalyi, A., Gevaert, O., Kyama, C. M., Simsa, P., Pochet, N., De Smet, F., ... D'Hooghe, T. M. (2010). Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(3), 654–664.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dep425>
- Mo, B., Vendrov, A. E., Palomino, W. A., DuPont, B. R., Apparao, K. B. C., & Lessey, B. A. (2006). ECC-1 cells: a well-differentiated steroid-responsive endometrial cell line with characteristics of luminal epithelium. *Biology of Reproduction*, 75(3), 387–394.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.051870>
- Mobli, M., Qaraaty, M., Amin, G., Haririan, I., Hajimahmoodi, M., & Rahimi, R. (2015). Scientific evaluation of medicinal plants used for the treatment of abnormal uterine bleeding by Avicenna. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 292(1), 21–35.
<https://doi.org/10.1007/s00404-015-3629-x>
- Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Arvatescu, C. A., Mironescu, A., Dracea, L., & Ples, L. (2016). The Role of Natural Polyphenols in the Prevention and Treatment of Cervical Cancer-An Overview. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(8).
<https://doi.org/10.3390/molecules21081055>
- Moghissi, K. S. (1990). Pseudopregnancy induced by estrogen-progestogen or progestogens alone in the treatment of endometriosis. *Progress in Clinical and Biological Research*, 323, 221–232. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2137617>
- Morassutto, C., Monasta, L., Ricci, G., Barbone, F., & Ronfani, L. (2016). Incidence and Estimated

- Prevalence of Endometriosis and Adenomyosis in Northeast Italy: A Data Linkage Study. *PloS One*, 11(4), e0154227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154227>
- Morotti, M., Vincent, K., & Becker, C. M. (2017). Mechanisms of pain in endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 209, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.07.497>
- Murphy, A. A. (2002). Clinical aspects of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 955(1), 1–10; discussion 34–6, 396–406. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02760.x>
- Nakahata, A. M., Bueno, N. R., Rocha, H. A. O., Franco, C. R. C., Chammas, R., Nakaie, C. R., ... Oliva, M. L. V. (2006). Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.05.008>
- Near, A. M., Wu, A. H., Templeman, C., Van Den Berg, D. J., Doherty, J. A., Rossing, M. A., ... Australian Ovarian Cancer Study Group (AOCS). (2011). Progesterone receptor gene polymorphisms and risk of endometriosis: results from an international collaborative effort. *Fertility and Sterility*, 95(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.059>
- Nisolle, M., & Donnez, J. (1997). Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and Sterility*, 68(4), 585–596. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)00191-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)00191-x)
- Nnoaham, K. E., Hummelshoj, L., Webster, P., D'Hooghe, T., de Cicco Nardone, F., de Cicco Nardone, C., ... World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. (2011). Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertility and Sterility*, 96(2), 366–373.e8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.090>
- Novak, E. (1931). Pelvic endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 22, 826–837.
- Núñez-Sánchez, M. A., García-Villalba, R., Monedero-Saiz, T., García-Talavera, N. V., Gómez-Sánchez, M. B., Sánchez-Álvarez, C., ... Espín, J. C. (2014). Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(6), 1199–1211.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300931>

- Ogata, K., Kurki, P., Celis, J. E., Nakamura, R. M., & Tan, E. M. (1987). Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Experimental Cell Research*, 168(2), 475–486. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90020-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90020-6)
- Olivares, C., Bilotas, M., Buquet, R., Borghi, M., Sueldo, C., Tesone, M., & Meresman, G. (2008). Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(12), 2701–2708. <https://doi.org/10.1093/humrep/den315>
- Olivares, Carla, Ricci, A., Bilotas, M., Barañao, R. I., & Meresman, G. (2011). The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertility and Sterility*, 96(2), 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.063>
- Oosterlynck, D. J., Cornillie, F. J., Waer, M., Vandeputte, M., & Koninckx, P. R. (1991). Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertility and Sterility*, 56(1), 45–51. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54414-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54414-8)
- Osuga, Y., Koga, K., Hirota, Y., Hirata, T., Yoshino, O., & Taketani, Y. (2011). Lymphocytes in endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 65(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00887.x>
- Ovadge, P., Roma, A., Steckle, M., Nicoletti, L., Arnason, J. T., & Pandey, S. (2015). Advances in the research and development of natural health products as main stream cancer therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 751348. <https://doi.org/10.1155/2015/751348>
- Ozkan, S., Murk, W., & Arici, A. (2008). Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 92–100. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.007>
- Pang, X., Fu, W., Wang, J., Kang, D., Xu, L., Zhao, Y., ... Du, G.-H. (2018). Identification of Estrogen Receptor α Antagonists from Natural Products via In Vitro and In Silico Approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 6040149. <https://doi.org/10.1155/2018/6040149>

- Parazzini, F., Esposito, G., Tozzi, L., Noli, S., & Bianchi, S. (2017). Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 209, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.04.021>
- Park, S.-H., Kim, J.-L., Lee, E.-S., Han, S.-Y., Gong, J.-H., Kang, M.-K., & Kang, Y.-H. (2011). Dietary ellagic acid attenuates oxidized LDL uptake and stimulates cholesterol efflux in murine macrophages. *The Journal of Nutrition*, 141(11), 1931–1937. <https://doi.org/10.3945/jn.111.144816>
- Pathania, S., Ramakrishnan, S. M., & Bagler, G. (2015). Phytochemica: a platform to explore phytochemicals of medicinal plants. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2015. <https://doi.org/10.1093/database/bav075>
- Pitchakarn, P., Chewonarin, T., Ogawa, K., Suzuki, S., Asamoto, M., Takahashi, S., ... Limtrakul, P. (2013). Ellagic Acid Inhibits Migration and Invasion by Prostate Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(5), 2859–2863. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.5.2859>
- Piwovarski, J. P., Granica, S., Zwierzyńska, M., Stefańska, J., Schopohl, P., Melzig, M. F., & Kiss, A. K. (2014). Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 801–809. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.032>
- Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 281, 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301>
- Pozarowski, P., Grabarek, J., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Flow cytometry of apoptosis. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 18, Unit 18.8. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1808s21>
- Press, R. E., & Hardcastle, D. (2007). Some physico-chemical properties of ellagic acid. *Journal of Applied Chemistry*, 19(9), 247–251. <https://doi.org/10.1002/jctb.5010190903>
- Qiu, Z., Zhou, B., Jin, L., Yu, H., Liu, L., Liu, Y., ... Zhu, F. (2013). In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.025>

- Quaas, A. M., Weedin, E. A., & Hansen, K. R. (2015). On-label and off-label drug use in the treatment of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 103(3), 612–625. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.01.006>
- Raiter-Tenenbaum, A., Barañao, R. I., Etchepareborda, J. J., Meresman, G. F., & Rumi, L. S. (1998). Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 261(3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s004040050214>
- Reis, F. M., Petraglia, F., & Taylor, R. N. (2013). Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Human Reproduction Update*, 19(4), 406–418. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt010>
- Ricci, A.G., Olivares, C. N., Bilotas, M. A., Bastón, J. I., Singla, J. J., Meresman, G. F., & Barañao, R. I. (2013). Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis. *Human Reproduction*, 28(1). <https://doi.org/10.1093/humrep/des369>
- Ricci, Analía G. (2012). Estudio de nuevas terapias naturales y antiangiogénicas para el tratamiento de la endometriosis. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Retrieved from http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5078_Ricci
- Ricci, Analía Gabriela, Olivares, C. N., Bilotas, M. A., Meresman, G. F., & Barañao, R. I. (2011). Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 18(7), 614–622. <https://doi.org/10.1177/19337191110395406>
- Rice, V. M. (2002). Conventional medical therapies for endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 955, 343–352; discussion 389–93, 396–406. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02795.x>
- Ríos, J.-L., Giner, R., Marín, M., & Recio, M. (2018). A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Medica*, 84(15), 1068–1093. <https://doi.org/10.1055/a-0633-9492>
- Rodgers, A. K., & Falcone, T. (2008). Treatment strategies for endometriosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(2), 243–255. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.2.243>
- Rokitansky, C. Von. (1860). Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus- und Ovarial-Sarcomen.

- (On the neoplasm of uterus glands on uterine and ovarian sarcomas). *Zeitschr Ges Aerzte Wien*, 16, 577–581. Retrieved from <https://wellcomecollection.org/works/xv5k8nzn>
- Rolla, E. (2019). Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Research*, 8, 529. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14817.1>
- Rosenfeld, D. L., & Lecher, B. D. (1981). Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 139(1), 105. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(81\)90418-x](https://doi.org/10.1016/0002-9378(81)90418-x)
- Rotondi, M., Labriola, D., Rotondi, M., Ammaturo, F. P., Amato, G., Carella, C., ... Panariello, S. (2002). Depot leuprorelin acetate versus danazol in the treatment of infertile women with symptomatic endometriosis. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 23(6), 523–526. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556096>
- Ru, J., Li, P., Wang, J., Zhou, W., Li, B., Huang, C., ... Yang, L. (2014). TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. *Journal of Cheminformatics*, 6, 13. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-13>
- Sacca, P. A., Creydt, V. P., Choi, H., Mazza, O. N., Fletcher, S. J., Vallone, V. B. F., ... Calvo, J. C. (2012). Human periprostatic adipose tissue: its influence on prostate cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 30(1), 113–122. <https://doi.org/10.1159/000339051>
- Sampson, J.A. (1927a). Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 14, 422–469.
- Sampson, J A. (1927b). Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American Journal of Pathology*, 3(2), 93-110.43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738>
- Sampson, John A. (1940). The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 40(4), 549–557. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(40\)91238-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(40)91238-8)
- Sancho, M., & Mach, N. (2014). [Effects of wine polyphenols on cancer prevention]. *Nutricion*

- Hospitalaria*, 31(2), 535–551. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.8091>
- Sasson, I. E., & Taylor, H. S. (2008). Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127(1), 106–115. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.014>
- Sato, J., Nasu, M., & Tsuchitani, M. (2016). Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, 29(3), 155–162. <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0021>
- Satyaswaroop, P. G., Zaino, R. J., & Mortel, R. (1983). Human endometrial adenocarcinoma transplanted into nude mice: growth regulation by estradiol. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4580), 58–60. <https://doi.org/10.1126/science.6849115>
- Savi, M., Bocchi, L., Mena, P., Dall'Asta, M., Crozier, A., Brighenti, F., ... Del Rio, D. (2017). In vivo administration of urolithin A and B prevents the occurrence of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0561-3>
- Schneider, C., Kässens, N., Greve, B., Hassan, H., Schüring, A. N., Starzinski-Powitz, A., ... Götte, M. (2013). Targeting of syndecan-1 by micro-ribonucleic acid miR-10b modulates invasiveness of endometriotic cells via dysregulation of the proteolytic milieu and interleukin-6 secretion. *Fertility and Sterility*, 99(3), 871–881.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.051>
- Schrodt, G. R., Alcorn, M. O., & Ibanez, J. (1980). Endometriosis of the male urinary system: a case report. *The Journal of Urology*, 124(5), 722–723. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)55627-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)55627-x)
- Schüring, A. N., Schulte, N., Kelsch, R., Röpke, A., Kiesel, L., & Götte, M. (2011). Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertility and Sterility*, 95(1), 423–426. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.035>
- Schwartz, A. S. K., Gross, E., Geraedts, K., Rauchfuss, M., Wölfler, M. M., Häberlin, F., ... Leeners, B. (2019). The use of home remedies and complementary health approaches in endometriosis. *Reproductive Biomedicine Online*, 38(2), 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.10.009>

- Schweppe, K. W. (2001). Current place of progestins in the treatment of endometriosis-related complaints. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 15 Suppl 6, 22–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12227883>
- Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., & Heber, D. (2006). Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *The Journal of Nutrition*, 136(10), 2481–2485. <https://doi.org/10.1093/jn/136.10.2481>
- Seidler, D. G., Faiyaz-Ul-Haque, M., Hansen, U., Yip, G. W., Zaidi, S. H. E., Teebi, A. S., ... Götte, M. (2006). Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (β 4GalT-7). *Journal of Molecular Medicine*, 84(7), 583–594. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0046-4>
- Selma, M. V., Beltrán, D., García-Villalba, R., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2014). Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. *Food Funct.*, 5(8), 1779–1784. <https://doi.org/10.1039/C4FO00092G>
- Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501. <https://doi.org/10.1021/jf902107d>
- Sepulcri, R. de P., & do Amaral, V. F. (2009). Depressive symptoms, anxiety, and quality of life in women with pelvic endometriosis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 142(1), 53–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.09.003>
- Setchell, K. D. R., Brown, N. M., & Lydeking-Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3577–3584. <https://doi.org/10.1093/jn/132.12.3577>
- Sharpe-Timms, K. L. (2001). Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 943, 131–147. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03797.x>
- Siedentopf, F., Tariverdian, N., Rütke, M., Kentenich, H., & Arck, P. C. (2008). ORIGINAL ARTICLE:

- Immune Status, Psychosocial Distress and Reduced Quality of Life in Infertile Patients with Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(5), 449–461. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00644.x>
- Signorile, P. G., & Baldi, A. (2010). Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(6), 778–780. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.008>
- Signorile, P. G., Viceconte, R., & Baldi, A. (2018). Novel dietary supplement association reduces symptoms in endometriosis patients. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 5920–5925. <https://doi.org/10.1002/jcp.26401>
- Sillem, M., Prifti, S., Monga, B., Arslin, T., & Runnebaum, B. (1999). Integrin-mediated adhesion of uterine endometrial cells from endometriosis patients to extracellular matrix proteins is enhanced by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin-1 (IL-1). *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 87(2), 123–127. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(99\)00114-1](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(99)00114-1)
- Simoens, S., Dunselman, G., Dirksen, C., Hummelshoj, L., Bokor, A., Brandes, I., ... D'Hooghe, T. (2012). The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(5), 1292–1299. <https://doi.org/10.1093/humrep/des073>
- Soares, S. R., Martínez-Varea, A., Hidalgo-Mora, J. J., & Pellicer, A. (2012). Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. *Fertility and Sterility*, 98(3), 529–555. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1120>
- Sobekova, K., Thomsen, M. R., & Ahrendsen, B. L. (2013). Market trends and consumer demand for fresh berries. *Agroinform Publishing House*, 2, 11–14. <https://doi.org/10.19041/apstract/2013/2-3/1>
- Somigliana, E., Benaglia, L., Viganò, P., Candiani, M., Vercellini, P., & Fedele, L. (2011). Surgical measures for endometriosis-related infertility: a plea for research. *Placenta*, 32 Suppl 3, S238–42. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.011>
- Spigoni, V., Mena, P., Cito, M., Fantuzzi, F., Bonadonna, R. C., Brighenti, F., ... Del Rio, D. (2016). Effects on Nitric Oxide Production of Urolithins, Gut-Derived Ellagitannin Metabolites, in Human Aortic Endothelial Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(8).

<https://doi.org/10.3390/molecules21081009>

Staal, A. H. J., van der Zanden, M., & Nap, A. W. (2016). Diagnostic Delay of Endometriosis in the Netherlands. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 81(4), 321–324. <https://doi.org/10.1159/000441911>

Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction (pp. 1–6). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1

Stratton, P., & Berkley, K. J. (2011). Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. *Human Reproduction Update*, 17(3), 327–346. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq050>

Symons, L. K., Miller, J. E., Kay, V. R., Marks, R. M., Liblik, K., Koti, M., & Tayade, C. (2018). The Immunopathophysiology of Endometriosis. *Trends in Molecular Medicine*, 24(9), 748–762. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.07.004>

Szylo, K., Tchorzewski, H., Banasik, M., Glowacka, E., Lewkowicz, P., & Kamer-Bartosinska, A. (2003). The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators of Inflammation*, 12(3), 131–138. <https://doi.org/10.1080/0962935031000134842>

Tabibzadeh, S., Kaffka, K. L., Kilian, P. L., & Satyaswaroop, P. G. (1990). Human endometrial epithelial cell lines for studying steroid and cytokine actions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association*, 26(12), 1173–1179. <https://doi.org/10.1007/bf02623695>

Taketani, Y., Kuo, T. M., & Mizuno, M. (1992). Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167(1), 265–270. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(11\)91672-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(11)91672-x)

Telimaa, S., Rönnerberg, L., & Kauppila, A. (1987). Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis after conservative surgery. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 1(4), 363–371. <https://doi.org/10.3109/09513598709082709>

- Tenenbaum, A., Barañao, R. I., Etchepareborda, J. ., Lavarello, M., Kesserú, E., & Rumi, L. S. (1992). Alteraciones en macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis y su relación con los niveles estrogénicos. *Medicina*, *52*, 452–453.
- Tesone, M., Bilotas, M., Barañao, R. I., & Meresman, G. (2008). The role of GnRH analogues in endometriosis-associated apoptosis and angiogenesis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, *66 Suppl 1*, 10–18. <https://doi.org/10.1159/000148026>
- Toki, T., Horiuchi, A., Li, S. F., Nakayama, K., Silverberg, S. G., & Fujii, S. (1996). Proliferative activity of postmenopausal endometriosis: a histopathologic and immunocytochemical study. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, *15*(1), 45–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8852446>
- Toklu, H. Z., Dumlu, M. U., Sehirli, O., Ercan, F., Gedik, N., Gökmen, V., & Sener, G. (2007). Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(9), 1287–1295. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.9.0014>
- Tomás-Barberán, F. A., García-Villalba, R., González-Sarrías, A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2014). Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(28), 6535–6538. <https://doi.org/10.1021/jf5024615>
- Tuttles, F., Keckstein, J., Ulrich, U., Possover, M., Schweppe, K. W., Wustlich, M., ... Tinneberg, H. R. (2005). [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralblatt Fur Gynakologie*, *127*(5), 275–281. <https://doi.org/10.1055/s-2005-836904>
- Tuttles, F., Keckstein, J., Ulrich, U., Possover, M., Schweppe, K. W., Wustlich, M., ... Tinneberg, H. R. (2012). ENZIAN 2012. Retrieved from http://www.endometriose-sef.de/dateien/ENZIAN_2013_web.pdf.
- Uchida, M., & Kobayashi, O. (2013). Sequential Observation of Implanted Endometriosis by Laparoscopy in Rats: Correlation Between the Prevalence Rate and the Estrous Cycle. *Journal of Pharmacological Sciences*, *121*(4), 299–304. <https://doi.org/10.1254/jphs.12180FP>
- Ujiki, M. B., Ding, X.-Z., Salabat, M. R., Bentrem, D. J., Golkar, L., Milam, B., ... Adrian, T. E. (2006).

- Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Molecular Cancer*, 5, 76. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-76>
- Ulukus, M., Cakmak, H., & Arici, A. (2006). The Role of Endometrium in Endometriosis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13(7), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.jsigi.2006.07.005>
- Valle, R. F., & Sciarra, J. J. (2003). Endometriosis: treatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 997, 229–239. <https://doi.org/10.1196/annals.1290.026>
- Van Der Zanden, M., Teunissen, D. A., Van Der Woord, I. W., Braat, D. D., Nelen, W. L., & Nap, A. W. (2019). Barriers and facilitators to the timely diagnosis of endometriosis in primary care in the Netherlands. *Family Practice*. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmz041>
- Varma, R., Rollason, T., Gupta, J. K., & Maher, E. R. (2004). Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(3), 293–304. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00020>
- Vercellini, P. (2003). Continuous use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhea that does not respond to a cyclic pill regimen. *Fertility and Sterility*, 80(3), 560–563. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00794-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00794-5)
- Vercellini, Paolo, Buggio, L., Frattaruolo, M. P., Borghi, A., Dridi, D., & Somigliana, E. (2018). Medical treatment of endometriosis-related pain. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 51, 68–91. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.01.015>
- Vercellini, Paolo, Viganò, P., Somigliana, E., & Fedele, L. (2014). Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(5), 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.255>
- Vicinanza, R., Zhang, Y., Henning, S. M., & Heber, D. (2013). Pomegranate Juice Metabolites, Ellagic Acid and Urolithin A, Synergistically Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth via Distinct Effects on Cell Cycle Control and Apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/247504>
- Viganò, P., Parazzini, F., Somigliana, E., & Vercellini, P. (2004). Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(2), 177–

200. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007>
- Vinatier, D., Dufour, P., & Oosterlynck, D. (1996). Immunological aspects of endometriosis. *Human Reproduction Update*, 2(5), 371–384. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.5.371>
- von Theobald, P., Cottenet, J., Iacobelli, S., & Quantin, C. (2016). Epidemiology of Endometriosis in France: A Large, Nation-Wide Study Based on Hospital Discharge Data. *BioMed Research International*, 2016, 3260952. <https://doi.org/10.1155/2016/3260952>
- Wang, L., & Martins-Green, M. (2014). Pomegranate and Its Components as Alternative Treatment for Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 14949–14966. <https://doi.org/10.3390/ijms150914949>
- Wang, Yizi, Ren, F., Li, B., Song, Z., Chen, P., & Ouyang, L. (2019). Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. *Journal of Cancer*, 10(15), 3303–3314. <https://doi.org/10.7150/jca.29738>
- Wang, Yun, Qiu, Z., Zhou, B., Liu, C., Ruan, J., Yan, Q., ... Zhu, F. (2015). In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.008>
- Wieser, F., Schneeberger, C., Tong, D., Tempfer, C., Huber, J. C., & Wenzl, R. (2002). PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 77(2), 309–312. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)02984-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)02984-3)
- Wilson, T. J., Hertzog, P. J., Angus, D., Munnery, L., Wood, E. C., & Kola, I. (1994). Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertility and Sterility*, 62(5), 1086–1088. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)57082-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)57082-4)
- Witz, C. A., Monotoya-Rodriguez, I. A., & Schenken, R. S. (1999). Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. *Fertility and Sterility*, 71(1), 56–60. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00400-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00400-2)
- Wu, M. Y., Yang, J. H., Chao, K. H., Hwang, J. L., Yang, Y. S., & Ho, H. N. (2000). Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 74(6), 1187–1191. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01592-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01592-2)

- Young, K., Fisher, J., & Kirkman, M. (2015). Women's experiences of endometriosis: a systematic review and synthesis of qualitative research. *Journal of Family Planning and Reproductive Health Care*, 41(3), 225–234. <https://doi.org/10.1136/jfprhc-2013-100853>
- Zeitvogel, A., Baumann, R., & Starzinski-Powitz, A. (2001). Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *The American Journal of Pathology*, 159(5), 1839–1852. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63030-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63030-1)
- Zhang, W., Chen, J.-H., Aguilera-Barrantes, I., Shiau, C.-W., Sheng, X., Wang, L.-S., ... Huang, Y.-W. (2016a). Urolithin A suppresses the proliferation of endometrial cancer cells by mediating estrogen receptor- α -dependent gene expression. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(11), 2387–2395. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600048>
- Zhang, W., Chen, J. H., Aguilera-Barrantes, I., Shiau, C. W., Sheng, X., Wang, L. S., ... Huang, Y. W. (2016b). Urolithin A suppresses the proliferation of endometrial cancer cells by mediating estrogen receptor- α -dependent gene expression. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(11), 2387–2395. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600048>