

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

Funcionalidad del parénquima ovárico adyacente a endometriomas: Estudio vascular inmunohistoquímico

Dr Martín Vilela

Versión acortada de la Tesis Doctoral del Dr Martín Vilela, aprobada por la Facultad de Medicina, UBA.

Reproducción 2014;30:48-58

Resumen

*Existen históricas controversias sobre la influencia de la cirugía del endometrioma sobre la función ovárica posterior, pero son escasas las investigaciones acerca de cuál es la influencia del endometrioma sobre el tejido ovárico que lo circunda, es decir, previo al accionar de la cirugía. Se plantea la hipótesis según la cual podría existir una alteración de la histología ovárica adyacente al quiste endometriósico con compromiso de la vascularización e irrigación del aparato folicular. **Objetivo.** Evaluar si la presencia de un endometrioma ovárico se asocia a una disminución en la fertilidad de la mujer a través de un mecanismo de alteración en la vascularización del parénquima ovárico que lo circunda, disminución de su población folicular y/o alteración de su índice de proliferación celular. **Material y métodos.** Evaluación sobre una cohorte prospectiva de pacientes en edad fértil con endometrioma ovárico unilateral operadas por laparoscopia. Posteriormente a la quistectomía se obtuvieron muestras para estudio del tejido ovárico adyacente al endometrioma resecado (grupo estudio) y del ovario contralateral sano de la misma paciente (grupo control). Se realizó recuento folicular histológico e in-*

*munohistoquímica para cuantificación de vascularización mediante tinción con anticuerpo monoclonal CD34 (específico para endotelio vascular) y para proliferación celular con PCNA. Asimismo, se evaluó correlación entre el tamaño del endometrioma ovárico y los parámetros mencionados del parénquima ovárico adyacente al quiste endometriósico. **Resultados.** Se evaluaron los tejidos ováricos adyacentes a quistes endometriósicos removidos y tejidos ováricos de ovarios contralaterales en 32 pacientes intervenidas quirúrgicamente. El promedio de edad de las pacientes fue $30,5 \pm 4,1$ años, (rango: 24 a 40). El promedio de tamaño de los quistes endometriósicos fue $5,05 \pm 1,59$ cm (rango: 3,5 a 8 cm). Se encontró significativa menor población folicular ($2,18 \pm 2,7$ vs $6,21 \pm 6,2$ folículos en campos 100X, $P < 0,05$), menor vascularización (área vascular relativa $2,87 \pm 1,65$ vs $4,46 \pm 2,4$, $P < 0,05$) y menor proliferación celular ($5,2 \pm 1,8$ vs $7,4 \pm 4,2$, $P < 0,05$) en los tejidos ováricos adyacentes a quistes endometriósicos en comparación a los tejidos ováricos sanos contralaterales. Por otra parte no se encontró correlación significativa entre el tamaño de los quistes endometriósicos y el número de folículos del parénquima ovárico adyacente [coeficiente r (Pearson) = $-0,24$, IC 95%: $-0,44 - 0,11$, $P = 0,17$, NS], ni con el patrón de vascularización [coeficiente r (Pearson) = $-0,054$, IC 95%: $-0,39 - 0,30$, $P = 0,76$, NS] ni con el pa-*

Correspondencia: Martín Vilela
E-mail: marvilela@yahoo.com

trón de proliferación celular de ese tejido [coeficiente r (Pearson)=0,129, IC 95%:-0,45 – 0,22, $P = 0,47$, NS]. **Conclusión.** La funcionalidad del tejido ovárico adyacente a un quiste endometriósico puede verse afectada por la presencia del mismo quiste ya que la población folicular, la vascularización y la proliferación celular del tejido adyacente a ese quiste se encuentran significativamente disminuidas cuando se las compara con similares parámetros del tejido ovárico contralateral sano de la misma paciente. Este compromiso tisular no se encuentra asociado al tamaño del quiste endometriósico en cuestión, lo cual sugiere que esta alteración se encuentra condicionada por la presencia del endometrioma mismo.

Palabras claves. Endometrioma, función ovárica, cd-34, fiv.

Ovarian tissue surrounding endometrioma function: vascular immunohistochemical analysis

Summary

Objective. To assess the function of ovarian tissue surrounding endometrioma by evaluating vascularization, follicle count and proliferation index. **Design.** Prospective study. **Materials and methods.** 32 patients less than 40 years old with clinical ovarian unilateral > 3cm endometrioma diagnosis were operated by laparoscopy. After ovarian stripping cystectomy, an ovarian surrounding endometrioma tissue sample was taken (study group); another ovarian tissue sample from contralateral ovary without endometrioma was taken as control group. Samples were processed for histological primordial follicle count, immunohistochemical vascular assesment with monoclonal CD34 antibody specific for endothelial cells and cell proliferation index with PCNA. Both study and control groups main outcome measures were compared by χ^2 and non-parametric tests. Statistical correlation between ovarian endometrioma size and immunohistochemical parameters was also tested. **Results:** Patients' average age was $30,5 \pm 4,1$ years. 7 endometriomas came from right ovary and 25 from left ovary. Endometriomas average size was $5 \pm 1,5$ cm (3,5 to 8 cm range). There was significantly lower primordial follicular count ($2,18 \pm 2,7$ vs $6,21 \pm 6,2$, $P < 0,05$), lower vascular immunos-

tained area ($2,87 \pm 1,65$ vs $4,46 \pm 2,4$, $P < 0,05$) and lower proliferation cell index ($5,2 \pm 1,8$ vs $7,4 \pm 4,2$, $P < 0,05$) in ovarian parenchyma surrounding endometriomas compared with ovarian contralateral tissue without endometrioma. No correlation was found between endometrioma size and primordial follicular count, vascular immunostained area, nor proliferation cell index of the endometrioma surrounding tissue [Pearson coefficient: -0,24 (IC 95%: -0,44 – 0,11, NS); -0,054 (IC 95%: -0,39 – 0,30, NS) and 0,129 (IC 95%: -0,45 – 0,22, NS) respectively]. **Conclusions.** Endometrioma affects surrounding ovarian tissue function as primordial follicle count, vascularization and proliferation cell index are diminished compared with contralateral non-endometrioma ovaries. These changes are not associated with endometrioma size.

Key words. Endometrioma, CD34, immunohistochemical, ovarian-function

Introducción

El endometrioma o quiste endometriósico es uno de los tumores ováricos con frecuente indicación quirúrgica en pacientes en edad reproductiva ya que se vincula a cuadros clínicos de esterilidad o de dolor pelviano crónico. Para su tratamiento, la técnica quirúrgica ideal es aquella que presente bajas tasas de recidiva, pero a la vez que respete al máximo las condiciones de vitalidad y vascularización del parénquima ovárico restante, ya que un grupo significativo de estas pacientes serán sometidas a estimulación ovárica posterior.

La técnica quirúrgica más frecuentemente utilizada es la cistectomía o decapsulación laparoscópica, con tasas de embarazo posterior variables según diferentes autores, que en algunos casos alcanzan hasta el 80%.¹ Sin embargo, algunos investigadores postulan que no existe una cápsula ovárica alrededor del endometrioma y que la extirpación de su pared puede provocar la pérdida de corteza ovárica viable, por lo que proponen otras técnicas alternativas (fenestración y coagulación de la superficie interna del quiste, con o sin administración posterior de agonistas GnRh).²⁻⁴ En el año 2005 la Colaboración Cochrane publicó un metaanálisis sobre trabajos prospectivos randomizados demostrando que la resección de la cápsula

del endometrioma es superior a las técnicas ablativas respecto de recurrencia del endometrioma, recurrencia de síntomas como dismenorrea y dolor pelviano crónico e, inclusive, en cuanto a tasas de embarazo espontáneo posteriores a la cirugía.⁵

El tratamiento del endometrioma previo a los procedimientos de FIV sigue siendo un tema de controversia, ya que existen publicaciones en las que se sostiene que éstos no deberían ser operados, dado que podría alterar su respuesta posterior. García Velasco y col sugieren que los resultados de FIV de pacientes operadas por endometrioma son similares a aquellas que no son intervenidas quirúrgicamente y se realizan el FIV en presencia del quiste endometriósico.⁶ Como contrapartida, Tinkanen comparó en forma retrospectiva las respuestas en FIV en pacientes operadas de endometriomas versus un grupo con recurrencia de endometrioma no operadas y la tasa de embarazo fue significativamente superior (38 vs 22%) en aquellas pacientes sin endometrioma.⁷ Estos resultados pueden reafirmarse por trabajos anteriores en los cuales se observa una menor tasa de ovocitos captados, número y calidad embrionaria en pacientes que presentan endometriomas durante el estímulo para el FIV.^{8,9} En experiencias previas de nuestro grupo de trabajo, comparando los resultados en FIV de pacientes operadas por endometrioma con los de pacientes que se realizan FIV por factor tubario (grupo control), éstos resultaron estadísticamente similares en cuanto a número de folículos, ovocitos captados, y embarazo.¹⁰

Hipótesis de trabajo

La gran mayoría de los trabajos de investigación en los que se evalúa la reserva ovárica o la respuesta ovárica a la estimulación folicular suelen incluir como factor de riesgo la influencia de cirugías ováricas previas, especialmente cuando se trata de endometriomas, ya que se postula que la agresión quirúrgica sobre el aparato folicular puede afectar a la respuesta ovárica. Sin embargo, son escasas las investigaciones acerca de cuál es la influencia del endometrioma por sí mismo sobre el tejido ovárico que lo circunda.¹¹⁻¹³ En estudios histológicos preliminares observacionales sobre tejido ovárico adyacente a quistes endometriósicos operados hemos hallado, en numerosos casos, la presencia de gran fibrosis capsular comprimiendo

al tejido ovárico adyacente y folículos englobados dentro de una gran fibrosis estromal.¹⁴ También observamos vasos de paredes gruesas, con hiperplasia de la íntima y calibre disminuido, con tinción de hematoxilina-eosina, aunque esto presentaba limitaciones en lo que era la evaluación histológica vascular.

Por este motivo se plantea la hipótesis según la cual podría existir una alteración de la histología ovárica adyacente al quiste endometriósico con compromiso de la vascularización e irrigación del aparato folicular. Es decir, la función ovárica se encontraría previamente dañada por efecto de la presencia del endometrioma mismo, y no sería la cirugía (si se practica mediante una técnica atraumática adecuada) la causante de este daño como se cree en general. En consecuencia, con el objetivo de confirmar, desechar o complementar esta hipótesis, me propuse realizar un estudio cuali-cuantitativo del parénquima ovárico adyacente al endometrioma, con el fin de evaluar la presencia de folículos, vascularización y proliferación de ese tejido.

Objetivo

El objetivo general de esta investigación es evaluar si la presencia de un endometrioma ovárico se asocia a una disminución en la fertilidad de la mujer a través de un mecanismo de alteración en la vascularización del parénquima ovárico que lo circunda, disminución de su población folicular y alteración de su índice de proliferación celular. Asimismo también se propone establecer si el tamaño del endometrioma influye en la vascularización y el número de folículos del ovario.

Materiales y métodos

Se realizó la evaluación sobre una cohorte prospectiva de pacientes con diagnóstico presuntivo de endometrioma ovárico unilateral por ecografía ginecológica transvaginal. Este diagnóstico fue confirmado mediante la realización de una cirugía laparoscópica con el objetivo de reseca ese quiste endometriósico. El sustrato de la investigación consistió en evaluar el parénquima ovárico adyacente al endometrioma (población expuesta) pareándolo con el parénquima ovárico del ovario contralateral sano de la misma paciente (población no expuesta).

Criterios de inclusión:

- Pacientes entre 20 y 40 años, con ciclos menstruales regulares, sometidas a laparoscopia por endometrioma unilateral, con ovario contralateral libre de proceso endometriósico.

Criterios de exclusión:

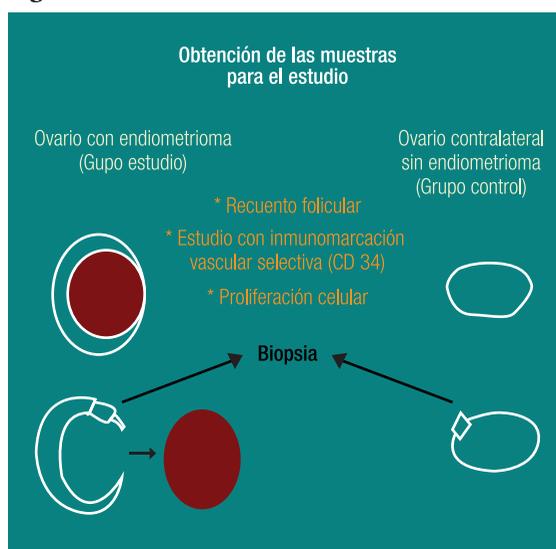
- Endometriomas incipientes (tamaño menor o igual a 1 cm).
- Menopausia precoz.
- Antecedente de cirugía previa sobre cualquiera de los dos ovarios.
- Presencia de algún otro tipo de patología ovárica (tumores no endometriósicos).
- Presencia de endometriosis en el ovario contralateral.

Las pacientes seleccionadas realizaron la cirugía laparoscópica entre los años 2004. Todas las pacientes fueron debidamente informadas y firmaron el consentimiento correspondiente. Luego se realizó el procesamiento histológico y de inmunohistoquímica de las muestras obtenidas y, por último, el procesamiento estadístico de los datos.

a) Obtención de las muestras para estudio:

- Población expuesta: (Grupo de estudio):
La obtención de las muestras para estudio se realizó a partir de pacientes intervenidas quirúrgicamente por presentar endometrioma unilateral. Durante la laparoscopia, luego de resecado el endometrioma (ver técnica de resección del endometrioma), se resecó una porción de tejido ovárico macroscópicamente sano (corteza y estroma) adyacente al quiste endometriósico (Figura 1).
- Población no expuesta (Grupo control):
Porción de tejido de ovario contralateral sano de la misma paciente.

El hecho de que el grupo control esté formado por los ovarios contralaterales sanos de las mismas pacientes con endometriomas constituyó una ventaja desde el punto de vista estadístico porque nos permitió homogeneizar ciertas características de ambas poblaciones que tienen gran impacto en el tipo de patología que se estudiaba (por ejemplo, edad, estadio de la endometriosis, presencia de esterilidad matrimonial, perfil hormonal ginecológico, etc).

Figura 1.*b) Técnica de resección del endometrioma*

Se utilizó la técnica laparoscópica de quistectomía del endometrioma (también llamada decapsulación o *stripping*) de la manera considerada menos traumática para el parénquima ovárico.¹⁵ Esta técnica consiste en disecar la cápsula del endometrioma del ovario mediante maniobras romas de tracción y contratracción suaves, en plano adecuado, de manera de no arrastrar parénquima ovárico. Esto se realiza previa punción, aspiración y lavado del contenido líquido achocolatado, ampliando con tijera el sitio sobre el cual se resecará el quiste. El logro de un correcto plano de clivaje entre la cápsula del endometrioma y el parénquima ovárico circundante constituye el paso más trascendental de esta cirugía, ya que si el plano no es el correcto, se corre el riesgo de dejar tejido endometriósico con altas posibilidades de recidiva temprana o, por el contrario, puede arrastrarse gran cantidad de parénquima ovárico sano con el consiguiente daño de la reserva folicular ovárica. La hemostasia posterior a la decapsulación se realiza con coagulador bipolar, de manera muy cuidadosa y selectiva.

c) Procesamientos de las muestras

Todas las muestras fueron procesadas y estudiadas de la misma manera: fijación en formol cálcico al 10%, deshidratación en serie ascendente de alcoholes, clarificación en xilol e inclusión en parafina. Secciones de 7 μ m con micrótomos *Mi-*

crom Heidelberg HM 350 y adhesión a portaobjetos cubiertos con gelatina 1% + alumbre de cromo 0,05% en H₂O destilada. Posterior coloración histológica con Hematoxilina – Eosina de acuerdo con las metodologías convencionales.

Parte 1: Evaluación de población folicular

El conteo se realizó al microscopio óptico con aumento de 100X de los cortes coloreados con Hematoxilina – Eosina distinguiendo todos los folículos primarios, secundarios y antrales presentes en un corte representativo de cada una de las muestras.

Parte 2: Patrón de vascularización ovárica

Para realizar la cuantificación de la angiogénesis en tejidos se tomó en cuenta:

La elección del anticuerpo para detección de la vasculatura constituye un elemento clave para una cuantificación precisa de la densidad microvascular. En este caso realizamos una tinción inmunohistoquímica específica para endotelio vascular. El CD34 es un anticuerpo monoclonal específico contra una proteína de membrana celular superficial que se expresa en endotelio vascular de pequeños vasos.^{16,17} Junto con el CD31, constituyen los marcadores cuantitativos más elegidos para estudios de angiogénesis por su robustez y su reproducibilidad.

Número de zonas analizadas:

Este número varía, entre distintos autores, de 3 a 5; sin embargo, esto debe ser analizado con precaución ya que tiene alta incidencia sobre el resultado final.

Los cortes histológicos fueron desparafinados con xilol e hidratados en una serie descendente de alcoholes. Posterior tratamiento con H₂O₂ 5% en PBS durante 10 min y con el bloqueante TNB durante 45 minutos a temperatura ambiente a fin de bloquear la actividad de peroxidases endógenas y los sitios de unión inespecífica, respectivamente. Luego fueron incubados durante toda la noche a 4°C con una dilución 1/50 del anticuerpo (*Monoclonal mouse anti-human CD34 class II[®], DakoCytomation, Dinamarca*). Al día siguiente fueron enjuagados con PBS e incubados sucesivamente con anticuerpo secundario biotinilado (anti-mouse IgG, Jackson Labs) y con Estreptavidina-Peroxidasa (*Zymed*) durante 45 minutos cada uno. Este proceso se repitió una vez más y se volvió a enjuagar con PBS.

Sistema de revelado y montaje:

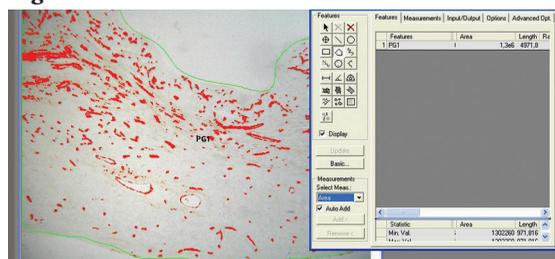
La inmunomarcación se evidenció mediante el revelado con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) (*DakoCytomation[®], Dinamarca*). Por último, se realizó una coloración de contraste (contracoloración) con Verde de Metilo y se montó en medio sintético para microscopía óptica.

Cuantificación:

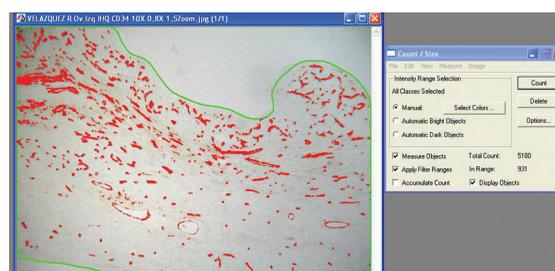
Para determinar el grado de vascularización de cada tejido se cuantificó el área ocupada por la inmunomarca mediante el uso del *software ImagePro Plus (Media Cybernetics[®])* creando rutinas automatizadas para medir áreas vasculares. Se tomaron fotografías de cortes representativos de cada muestra con un aumento final de 120X en un microscopio de luz blanca (*Reichert Polyvar*) y se fijó una escala correspondiente al aumento para relacionar los píxeles con μm^2 . Se delimitó manualmente el perímetro de cada vaso y luego se calculó el área comprendida por el mismo. Por último, se calculó el área total de la foto analizada. El área vascular relativa se determinó dividiendo el área vascular absoluta (definida como la suma de las áreas de todos los vasos correspondientes a una foto) por el área total de cada foto.

A continuación, se muestra gráficamente el proceso de cuantificación vascular:

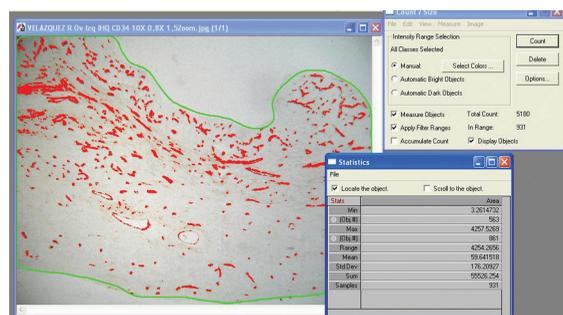
Figuras 2.



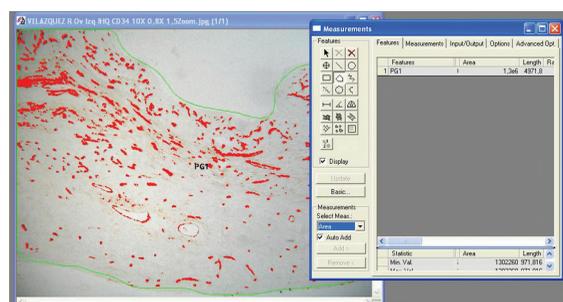
Se comienzan a seleccionar por color todos los puntos de la imagen en los que hay inmunomarca y se los "pinta" de color rojo.



Se realiza el conteo de todo lo que había sido "pintado" de rojo, exclusivamente dentro del área seleccionada en el paso anterior.



Se obtiene el dato del área total ocupada por la inmunomarca



Se mide del área dentro de la cual se realizó la medición para poder obtener el dato del % área marcada / área total.

Parte 3: Patrón de proliferación celular

Para la evaluación de proliferación celular se realizó inmunomarcación con PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), una proteína de 36 kDa, ácida nuclear no histónica, que actúa como proteína auxiliar de la ADN polimerasa delta, indispensable en la síntesis de ADN.¹⁸ Su expresión comienza en la fase G1 del ciclo celular, alcanza un máximo en la fase S y disminuye en la fase G2. Tiene una vida media de más de 20 horas. El procesamiento y cuantificación se realizó de manera similar al CD34.

Parte 4: Correlación entre tamaño del endometrioma, población folicular, patrón de vascularización ovárica y proliferación celular.

Se realizó un estudio de correlación estadística para evaluar si existe relación entre el tamaño del quiste endometriósico y la población folicular del tejido ovárico circundante, su patrón de vascularización y el grado de proliferación celular.

Métodos y modelos de análisis estadístico de los datos según tipo de variables

El análisis estadístico incluye la comparación entre la cantidad de folículos primordiales, prima-

rios, secundarios, número de vasos capilares e índice de proliferación por inmunohistoquímica por campo entre la población expuesta y no expuesta. Dado que se trata de variables continuas, este análisis se realizó mediante *prueba de T* para datos pareados (ya que su distribución fue paramétrica normal). Los resultados son expresados a través de una media y desvío estándar. La evaluación de la correlación fue realizada mediante el *coeficiente r de Pearson* para distribuciones gaussianas.

Para calcular el tamaño muestral fue necesario conocer cuál era la cantidad esperable de folículos por campo microscópico en una mujer sana en edad fértil. En este aspecto, la literatura sobre el tema presentaba diferentes criterios de recuento folicular (recuentos foliculares globales o discriminando folículos primordiales, primarios, preantrales, etc) y diferentes aumentos. Esta variabilidad en los datos dificultó establecer una presunción certera sobre cuál sería el número de folículos presentes en las biopsias de nuestra población, por lo cual la proyección de un tamaño muestral adecuado podía ser imprecisa. Se proyectó, a modo de ejemplo, según Hovatta y col,¹⁹ que la media de folículos por campo de 100X en pacientes sin patología ovárica es de 11 ± 6 . Presumiendo, según la hipótesis del presente proyecto de tesis, una disminución del 50% de la población folicular de parénquimas ováricos adyacentes a endometriomas, la población mínima necesaria para poder demostrar diferencia significativa con un poder estadístico del 80% y un error alfa de 0,05, sería de 18 pacientes. Sin embargo, dada la variabilidad antes mencionada, se amplió el tamaño muestral a 32 pacientes (32 ovarios con endometriomas y 32 sin endometriomas) con el fin de generar mayor robustez para el análisis.

Resultados

Consideraciones generales

Se evaluaron los tejidos ováricos adyacentes a quistes endometriósicos removidos y tejidos ováricos de ovarios contralaterales en 32 pacientes intervenidas quirúrgicamente. En todos los casos hubo confirmación histopatológica de la naturaleza endometriósica de los quistes extraídos.

El promedio de edad de las pacientes fue $30,5 \pm 4,1$ años, con un rango de 24 a 40.

El promedio de tamaño de los quistes endometriósicos fue $5,05 \pm 1,59$ cm con un rango de 3,5

a 8 cm. En 7 de los casos los quistes endometriósicos correspondieron al ovario derecho, mientras que en los 25 restantes al ovario izquierdo.

Parte 1: Evaluación de población folicular

En la Figura 12 se señala el número de folículos (sumados primordiales, primarios y secundarios) por campos de 100X de cada una de las muestras ováricas evaluadas de cada paciente.

A continuación, en la Tabla 1 se exponen los datos estadísticos respecto de la evaluación de la población folicular de tejidos adyacentes a endometriomas (Columna A) y tejidos de ovario contralateral sano (Columna B).

Como puede observarse los tejidos ováricos adyacentes a quiste endometriósico presentaron un promedio de $2,18 \pm 2,7$ folículos, mientras que los tejidos ováricos contralaterales sanos de las mismas pacientes presentaron un promedio de $6,21 \pm 6,2$ folículos. Comparando estos valores se encontró una diferencia significativamente superior en el recuento folicular de tejidos ováricos sanos sin endometrioma (valor de $P = 0,0014$, a dos colas,

con intervalo de confianza 95%: 1,61 – 6,44). Sin embargo, siendo que los desvíos *standard* de ambos grupos presentaban una diferencia extremadamente significativa ($P < 0,0001$), se realizó un *test* no paramétrico (Mann Whitney) cuyo resultado arrojó un valor de $P = 0,0005$, que confirmó la diferencia significativa entre ambos grupos.

Parte 2: Patrón de vascularización ovárica

Se analizó la expresión inmunohistoquímica de CD34 (antígeno específico para endotelio vascular) en las muestras analizadas.

En la Figura 13 se señalan los valores de las áreas relativas vasculares calculadas como se explicitó en materiales y métodos, de los tejidos ováricos correspondientes a cada una de las muestras ováricas evaluadas de cada paciente.

A continuación, en la Tabla 2 se exponen los datos estadísticos respecto de la evaluación del área vascular relativa marcada por inmunohistoquímica de tejidos adyacentes a endometriomas (Columna A) y tejidos de ovario contralateral sano (Columna B).

Se observó una disminución significativa en el área vascular relativa ocupada por vasos marcados con CD34 en los tejidos ováricos adyacentes a quiste endometriósico ($2,87 \pm 1,65$) respecto del área vascular de los tejidos contralaterales sanos ($4,46 \pm 2,4$). Esta diferencia en la vascularización ovárica arrojó un valor de $P = 0,0038$, a dos colas, con IC 95%: 0,53 – 2,64. Al igual que en la evaluación de la población folicular, también en este caso realizamos *test* no paramétrico de Mann-Whitney, dado que los

Figura 12.

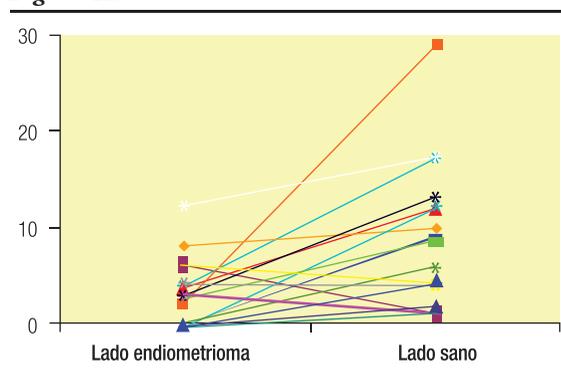


Tabla 1.

| Parámetro: | Ovario con endometrioma | Ovario contralateral |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|
| Número: | 32 | 32 |
| Promedio: | 2.188 | 6.219* |
| Desvío <i>standard</i> : | 2.776 | 6.236 * |
| Error <i>standard</i> : | 0.4907 | 1.102 |
| Mínimo: | 0.000 | 0.000 |
| Máximo: | 12.000 | 29.000 |
| Mediana: | 2.000 | 4.000 |
| IC 95% inferior: | 1.186 | 3.970 |
| IC 95% superior: | 3.189 | 8.467 |

* Valor de $p=0.0014$

Figura 13.

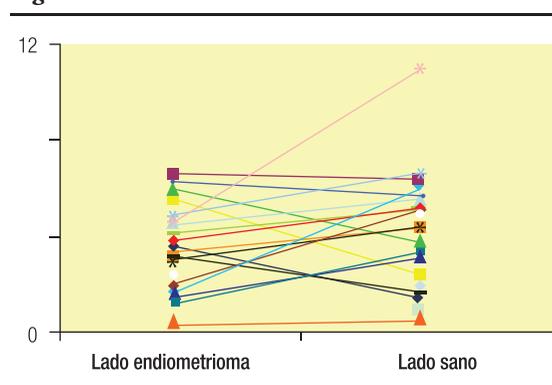


Tabla 2.

| Parámetro: | Lado Endometrioma | Lado sano |
|--------------------------|-------------------|-----------|
| Número: | 32 | 32 |
| Promedio: | 2.876 | 4.464* |
| Desvío <i>standard</i> : | 1.653 | 2.489* |
| Error <i>standard</i> : | 0.2922 | 0.4400 |
| Mínimo: | 0.1320 | 0.2340 |
| Máximo: | 6.259 | 10.790 |
| Mediana: | 2.552 | 4.525 |
| IC 95% inferior: | 2.279 | 3.567 |
| IC 95% superior: | 3.472 | 5.362 |

*Valor de $p=0.0038$ **Tabla 3.**

| Parámetro: | Lado Endometrioma | Lado sano |
|--------------------------|-------------------|-----------|
| Número: | 32 | 32 |
| Promedio: | 5.294 | 7.478* |
| Desvío <i>standard</i> : | 1.812 | 4.205* |
| Error <i>standard</i> : | 0.3203 | 0.7434 |
| Mínimo: | 2.300 | 3.800 |
| Máximo: | 10.020 | 28.080 |
| Mediana: | 4.800 | 6.750 |
| IC 95% inferior: | 4.645 | 5.962 |
| IC95% superior: | 5.952 | 8.995 |

*Valor de $p=0.0011$

desvíos *standard* de ambas muestras presentaban una diferencia significativa. El test no paramétrico arrojó un valor de $P=0,0071$, confirmando la disminución significativa de la vascularización ovárica de los tejidos ováricos adyacentes a quistes endometriósicos.

Parte 3: Patrón de proliferación celular

En la Figura 14 se transcriben los valores de marcación inmunohistoquímica de antígeno PCNA calculadas de los tejidos ováricos correspondientes a cada una de las muestras ováricas evaluadas de cada paciente.

A continuación, en la tabla 3 se exponen los datos estadísticos respecto de la evaluación de proliferación celular marcada por inmunohistoquímica de tejidos adyacentes a endometriomas (Columna A) y tejidos de ovario contralateral sano (Columna B).

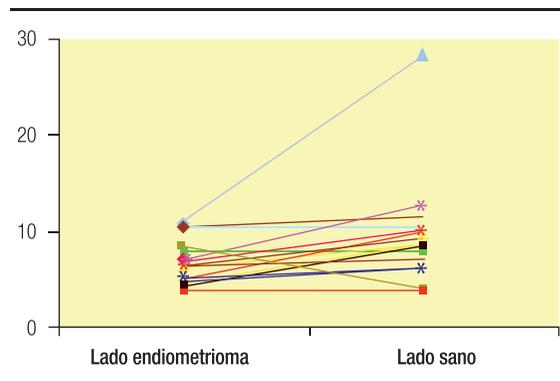
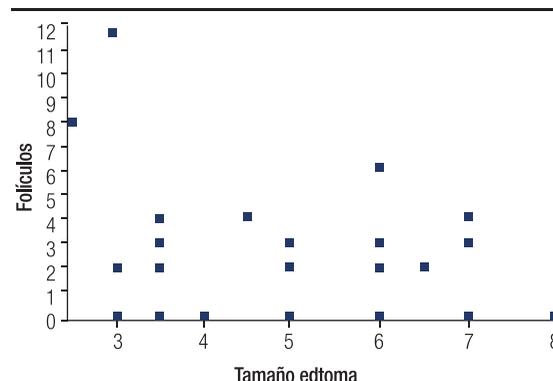
Como puede observarse, los tejidos ováricos adyacentes a quiste endometriósico presentaron un promedio de inmunomarcación para proliferación celular de $5,29 \pm 1,8$, significativamente

superior que en los tejidos ováricos contralaterales sanos de las mismas pacientes, cuyo promedio fue $7,47 \pm 4,2$ (valor de $P=0,0011$, a dos colas, con intervalo de confianza 95%: $-3,41$ a $-0,94$).

Parte 4: Correlación entre tamaño del endometrioma, población folicular, patrón de vascularización ovárica y proliferación celular

Se realizaron pruebas estadísticas para evaluar si existía correlación entre el tamaño del endometrioma ovárico y el número de folículos, el patrón de vascularización y el índice de proliferación celular del parénquima ovárico adyacente al quiste endometriósico.

Al realizar la evaluación estadística no se encontró correlación significativa entre el tamaño de los quistes endometriósicos y el número de folículos del parénquima ovárico adyacente (coeficiente de correlación r Pearson = $-0,24$, IC 95%: $-0,44$ – $0,11$, $P=0,17$, no significativo) (Figura 15).

Figura 14.**Figura 15.** Correlación recuento folicular y tamaño del endometrioma.

Tampoco se encontró correlación significativa con el patrón de vascularización ovárica del tejido ovárico adyacente biopsiado [coeficiente de correlación r (Pearson) = -0,054, IC 95%: -0,39 – 0,30, $P = 0,76$, no significativo] ni con el patrón de proliferación celular de ese tejido [coeficiente de correlación r (Pearson) = 0,129, IC 95%: -0,45 – 0,22, $P = 0,47$, no significativo] (Figuras 16 y 17).

Figura 16. Correlación vascularización y tamaño del endometrioma.

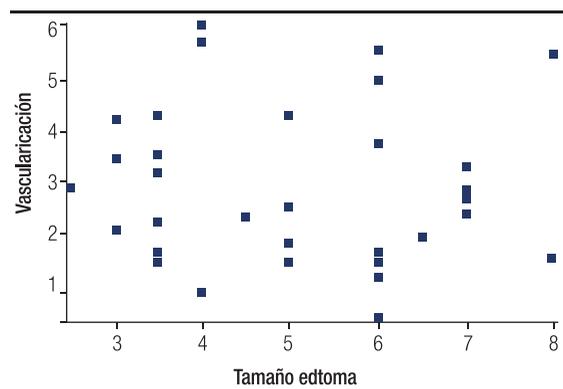
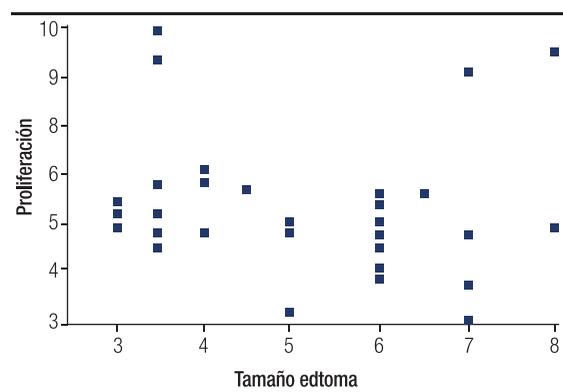


Figura 17. Correlación proliferación celular y tamaño del endometrioma.



Discusión

Las controversias alrededor del endometrioma ovárico podrían plantearse desde dos puntos de vista:

- Influencia de la cirugía del endometrioma sobre la funcionalidad ovárica.
- Influencia del endometrioma por sí mismo sobre la funcionalidad ovárica.

En la introducción se planteó el problema de la cirugía del endometrioma y sus posibles repercusiones sobre la funcionalidad ovárica.

Son escasos los trabajos de investigación que evalúan el efecto de la presencia del endometrioma sobre la funcionalidad ovárica. Algunos postulan que podría influir comprometiendo su vascularización, pero esto ha sido evaluado de manera parcial en relación con algunos criterios histológicos o también mediante el *doppler* de arterias ováricas. La Torre y col evaluaron los índices de pulsatilidad y resistencia de los principales vasos ováricos antes y después de la resección de endometriomas, y observaron que la resistencia vascular disminuía (0,81 a 0,73) luego de la intervención quirúrgica, lo cual sugiere que la afección vascular puede deberse a efectos propios del endometrioma sobre el tejido ovárico adyacente.²⁰ Más recientemente Somigliana y col han mostrado diferencias significativas en cuanto a vascularización por *doppler* de arteria ovárica y la respuesta folicular de ovarios operados por endometriomas versus el ovario contralateral sano de la misma paciente.²¹ Por otra parte, Chang y col evaluaron la reserva ovárica a través del volumen ovárico y el dosaje de hormona antimulleriana (AMH) antes y después de la cirugía del endometrioma²² mostrando niveles que caen significativamente en las semanas posteriores a la cirugía pero que se encuentran recuperadas luego de los 3 meses posteriores a la cirugía.

Algunos autores postulan que la cirugía conservadora del ovario en el caso de endometriomas implica riesgos para el potencial de fertilidad, dado que sostienen que la disección de la pared del quiste no es una técnica que implique una separación de tejidos y que se podría, en forma inadvertida, arrastrar folículos. Recientemente Alborzi y col reportaron que en la cirugía laparoscópica de quistes ováricos benignos, se encuentra tejido ovárico extraído de manera inadvertida mediante el estudio histopatológico en el 60% de los quistes endometriósicos, mientras que en quistes no endometriósicos es solo en el 32%.²³ Sin embargo, Muzzii y col también reportan en una revisión que el 54% de los endometriomas resecados por técnica de quistectomía presentan tejido ovárico reconocible, pero realizando un estudio más exhaustivo en la histología, este tejido no mostraba las características morfológicas del ovario normal.²⁴ Por otra parte,

Maneschi y col, en un estudio previo sobre el tejido adyacente a cortezas de quistes ováricos resecaados quirúrgicamente, describen la presencia de tejido ovárico de característica normal en el 80% de las muestras de quistes ováricos no endometriósicos (cistoadenomas, teratomas), mientras que solo se reconoció tejido ovárico normal en el 19% de los endometriomas.²⁵ Existen también descripciones histopatológicas de parénquimas ováricos adyacentes a quistes endometriósicos en las que se observó una disminución de la vascularización con técnica de hematoxilina-eosina y con técnicas de inmunohistoquímica para factor VIII específica para endotelio vascular, aunque en estos trabajos no se comparó con parénquimas ováricos normales.^{26,27}

Los resultados de este trabajo de investigación pretenden demostrar un efecto deletéreo del endometrioma sobre el tejido ovárico que lo circunda. Cabe destacar, como se señaló en la parte de metodología, que las diferencias significativas tanto en el conteo folicular, proliferación celular y vascularización de los tejidos ováricos adyacentes a endometriomas respecto de los ovarios contralaterales no pueden de ninguna manera estar influidas por la edad, el perfil hormonal u otras patologías ya que se trata de los ovarios de la misma paciente que fueron extraídos en el mismo acto quirúrgico, por lo cual están ambos tejidos sometidos a la misma condición etaria y hormonal. Otra cuestión que merece destacarse es el hecho de que las porciones de tejido ovárico adyacentes al endometrioma evaluadas corresponden al sitio de mayor distensión por parte del quiste y no a la parte hiliar ovárica, ya que estudios histológicos previos han demostrado que en ese sector del ovario el grosor de la cápsula del endometrioma es mayor y existe, como es lógico suponer, una mayor vascularización.²⁸ Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que existe una distribución medianamente uniforme de los folículos en toda la corteza ovárica.²⁹

Con respecto a la relación entre el número de folículos contados con el tamaño del quiste endometriósico en cuestión ("Resultados – Parte 4"), la correlación de estas dos variables no fue significativa, como tampoco lo fue la correlación entre el tamaño del quiste y la proliferación celular. Este hallazgo permitiría concluir que la afección folicular y proliferativa ovárica no depende de una cuestión compresiva provocada por el tamaño del quiste,

sino que es independiente del volumen tumoral; se asocia a la sola presencia del endometrioma.

El análisis de la vascularización del tejido adyacente al quiste endometriósico es de trascendental importancia, ya que este tipo de pacientes que son intervenidas quirúrgicamente, en muchos casos pueden recibir tratamientos de fertilización asistida posterior. Existen numerosos trabajos que cuestionan a la cirugía del endometrioma por el hecho de que en teoría se estaría arrastrando tejido ovárico^{29,30} y sería la causa de alteración de la vascularización ovárica. Sin embargo, estudios más recientes sobre *stress* oxidativo muestran lo contrario. Matzuzaki y col mostraron niveles de expresión disminuidos de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), que es un marcador de daño de ADN relacionado con el *stress* oxidativo, en tejidos ováricos que rodeaban quistes endometriósicos. Esto podría generar secundariamente un daño en la calidad ovocítica. Si bien no existen hasta el momento trabajos sobre calidad ovocítica posterior a la cirugía del endometrioma, es reconocido el hecho de que una *stripping* laparoscópico en manos experimentadas no afecta la respuesta ovárica posterior en FIV.³²

En sintonía con ese postulado nuestros resultados muestran, mediante una tinción inmunohistoquímica específica para endotelio vascular, que la vascularización del tejido ovárico adyacente al quiste endometriósico está significativamente disminuido, demostrando de manera más categórica la influencia del endometrioma sobre el tejido ovárico adyacente.

Como conclusión podemos afirmar que los resultados de esta investigación demuestran que la funcionalidad del tejido ovárico adyacente a un quiste endometriósico puede verse afectada por la presencia del mismo quiste, ya que la población folicular, la vascularización y la proliferación celular del tejido adyacente a ese quiste se encuentran significativamente disminuidas cuando se las compara con la población folicular, la vascularización y la proliferación celular del tejido del ovario contralateral sano de la misma paciente. Por otra parte, este compromiso tisular no se encuentra asociado al tamaño del quiste endometriósico en cuestión, lo cual sugiere que esta alteración se encuentra condicionada por la presencia del endometrioma mismo.

Agradecimientos. A los Dres Guillermo Marconi, Edgardo Young, Luis Auge y Dante Paz.

Referencias

1. Adamson G. Treatment of endometriosis-associated infertility. *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15:263-271.
2. Hemmings R, Bissonnette F, Bouzayen R. Results of laparoscopic of ovarian endometriomas: laparoscopic ovarian fenestration and coagulation. *Fertil Steril* 1998; 70:527-529.
3. Favez J, Vogel M. Comparison of different treatment methods of endometriomas by laparoscopy. *Obstet Gynecol* 1991; 78:660-665.
4. Donnez J, Nisolle M, Gillerot S, Anaf V, Cercckx-Braun F, Casanas-Roux F. Ovarian endometrial cysts: the role of gonadotrophin-releasing hormone agonist and/or drainage. *Fertil Steril* 1994; 62: 63-66.
5. Hart R, Hickey M, Maouris P, Buckett W and Garry R. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata: a Cochrane Review. *Human Reproduction* 2005;20(11):3000-3007.
6. García-Velasco J, Mahutte N, Corona J, Zuñiga V, Gilés J, Arici A, Pellicer A. Removal of endometriomas before in vitro fertilization does not improve fertility outcomes; a matched, case-control study. *Obstet Gynecol Surv* 2004;59:661-662.
7. Tinkanen H, Kujansuu E. In vitro fertilization in patients with ovarian endometriomas. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79:119-122.
8. Yanushpolsky E, Best C, Jackson K, Clarke R, Barbieri R, Hornstein M. Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a prospective, case controlled study. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(4):193-197.
9. Dlugi A, Loy R, Dieterle S, Bayer S, Seibel M. The effect of endometriomas on in vitro fertilization outcome. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1989; 6:338-341.
10. Marconi G, Vilela M, Quintana R, Sueldo C. Laparoscopic ovarian cystectomy of endometriomas does not affect the ovarian response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril* 2002 Oct;78(4):876-878.
11. Lass A. Assessment of ovarian reserve – is there a role for ovarian biopsy? *Hum Reprod* 2001; 16:1055-1057.
12. Arrighi L, Nicholson R, Gómez Rueda de Leverone N, Di Paola G, Young E, Tempone, A. Biopsia de ovario translaparoscópica: Técnica y evaluación de sus aplicaciones clínicas. *Obstet y Ginec Lat Amer* 1973;31:387.
13. Sykes D, Ginsburg J. The use of laparoscopic ovarian biopsy to assess gonadal function. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 112:408-413.
14. Vilela M, Marconi G. La laparoscopia en endocrinología reproductiva. En: Ed. Ascune Hnos. "Diagnóstico y terapéutica en endocrinología reproductiva" – SAEGRE (Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva), 2004:619-625.
15. Marconi G, Vilela M, Vighi S, Lombardi E, Yuri M. La cirugía laparoscópica en la paciente estéril con endometrioma. Cuadernos de medicina reproductiva. Ed. Médica Panamericana 2002, Vol 8 (1):101-120.
16. Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos J. Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur J Immunol* 1995; 25:1508-1516.
17. Inan S, Kescu N, Vatanserver S, Ozbilgin K, Koyuncu F, Sayhan S. Increased vascular surface density in ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17: 143-150.
18. Takasaki Y, Robinson W, Tan E. Proliferating cell nuclear antigen in blast crisis cells of patients with chronic myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 655-661.
19. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston R. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod* 1997;12:1032-1032.
20. La Torre R, Montanino-Oliva M, Marchiani E, Boninfante M, Montanino G, Cosmi. Ovarian blood flow before and after conservative laparoscopic treatment for endometrioma. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998; 25:12-14.
21. Somiglana E, Ragni G, Benedetti F, Borroni R, Vegetti W, Crosignani P. Does laparoscopic excision of endometriotic ovarian cysts significantly affect ovarian reserve? Insights from IVF cycles. *Hum Reprod* 2003; 18:2450-2453.
22. Chang H, Han S, Jee B, Lee B, Suh Ch, Kim S. Impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve: serial changes of serum anti-Müllerian hormone levels. *Fertil Steril* 2010; 94: 343-349.
23. Alborzi S, Foroughinia L, Kumar P, Asadi N, Alborzi S. A comparison of histopathologic findings of ovarian tissue inadvertently excised with endometrioma and other kinds of benign ovarian cyst in patients undergoing laparoscopy versus laparotomy. *Fertil Steril* 2009;92:2004-2007.
24. Muzzi L, Bianchi A, Croce C, Mancini N, Panici P. Laparoscopic excision of ovarian cysts: is the stripping technique a tissue-sparing procedure? *Fertil Steril* 2002; 77:609-614.
25. Maneschi F, Marasá L, Incandela S, Mazzaresse M, Zupi E. Ovarian cortex surrounding benign neoplasms: A histologic study. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:388-393.
26. Russell P, Farnsworth A. Endometriosis Surgical Pathology of the Ovaries. Second Edition. Peter Russell and Annabelle Farnsworth Editors. Second Edition. Churchill Livingstone, 1997:209.
27. Polan ML, Henzl MR, Hornstein MD. The second decade of GnRH agonists: In vitro fertilization and endometriosis. A symposium. *J Reprod Med* 1998; 43S:243-293.
28. Lass A, Silye R, Abrams D, Krausz T, Hovatta O, Margara R, Winston R. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997; 12:1028-1031.
29. Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. Variation at different ages. *Acta Anat* 1952; 14:108-123.
30. Esinler I, Bozdogan G, Aybar F, Bayar U, Hakan Yarali H. Outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection after laparoscopic cystectomy for endometriomas. *Fertil Steril* 2006;85:1730-1735.
31. Matsuzaki S, Schubert B. Oxidative stress status in normal ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 93: 2431-2432.
32. Canis M, Pouly J, Tamburro S, Mage G, Wattiez A, Bruhat M. Ovarian response during IVF-embryo transfer cycles after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts of > 3cm in diameter. *Hum Reprod* 2001; 16: 2583-2586.