

Facultad de Medicina  
Universidad de Granada  
España



IDENTIFICACIÓN DE LOS PATRONES  
HISTOLÓGICOS Y DE MOLÉCULAS  
EXTRACELULARES DEL OVIDUCTO HUMANO  
PARA SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR.

TESIS DOCTORAL

Sr. Carlos Ignacio Godoy Guzmán

Programa de Doctorado en Biomedicina

*Directores:*

*Prof. Dr. Antonio Campos Muñoz y Prof. Dr. Víctor Carriel Araya,*

*Departamento de Histología, Ingeniería Tisular, Universidad de Granada, España*

2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Carlos Ignacio Godoy Guzmán  
ISBN: 978-84-1306-096-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54776>

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo original:

Distribution of extracellular matrix molecules in human uterine tubes during the menstrual cycle: a histological and immunohistochemical analysis.

**Godoy-Guzman C**, Núñez C, Orihuela P, Campos A, Carriel V. (2018).

Journal of Anatomy Jul;233(1):73-85. doi: 10.1111/joa.12814. Epub 2018 Apr 16.

Datos según el Journal Citation Report 2017: Factor de impacto: 2,479; Área: Anatomía/Morfología; Quartil 1(4/21).

Los estudios de esta Tesis Doctoral fueron financiados por el Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS-115 y por la Vicerrectoría de Investigación, Desarrollo e Innovación de la Universidad de Santiago de Chile, proyecto DICYT no. 021501GG, FB0807.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis doctoral, quienes no sólo aportaron a mi formación disciplinar e investigadora a través de su conocimiento, sino que también a través de su ejemplo y experiencia de vida.

Gracias al Prof. Dr. Antonio Campos por su constante estímulo, mostrándome la Histología no sólo como una ciencia descriptiva, sino como una ciencia en constante cambio y su actual renacimiento a través de la Ingeniería Tisular. Nunca olvidaré aquella historia que me contó sobre el catedrático Charles Leblond de la Universidad McGill, uno de los histólogos más importantes del siglo XX, donde en un artículo que publicó en 1981, señala: *En 1931 a la edad de 20 años tuve mi primer contacto con la Histología. Mis amigos intentaron disuadirme diciendo “Histología, es un caballo muerto. El futuro es la bioquímica”. Yo elegí la Histología, trabajé 50 años y nunca me arrepentí. Muchas cosas excitantes han ocurrido en la Histología durante los últimos 50 años: el resurgimiento de la histoquímica, el nacimiento de la microcopia electrónica, la autoradiografía, todas poderosas coces de un caballo muerto.*

Gracias al Prof. Dr. Víctor Carriel por su tiempo y dedicación e innumerables consejos y aportes que permitieron el desarrollo de esta tesis. Además, por su pasión por la Histología y la Ingeniería Tisular.

También, quiero agradecer al equipo de profesores y profesoras del Departamento de Histología e Ingeniería Tisular de la UGR. En especial al Prof. Miguel Alaminos, Prof. Miguel Ángel Martín, Prof. Ingrid Garzón y la Prof. Carmen Sánchez-Quevedo por su apoyo en diferentes ámbitos de mi formación.

Además, quiero agradecer a mis compañeros y amigos de laboratorio: Fernando Campos, Boris Damian, Daniel Durand, Gerson Vizcaíno, Alejandro Vela y Jesús Chato, los cuales llenaron de alegría las arduas jornadas de trabajo en el laboratorio.

Gracias a la Prof. Monica Osses, por acogerme y orientarme en mis primeros pasos en el mundo de la Histología. También, agradezco a la Escuela de Medicina de la Universidad de Santiago de Chile.

A mis padres Carlos Godoy y Rosa Guzmán, hermanos y tía Verónica Guzmán por su cariño y apoyo incondicional y por inculcarme desde niño el gusto por la lectura.

A todos mis más sinceros, agradecimientos.

## *Listado de abreviaturas*

CSAG: Carcinoma de alto grado

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GAG: Glicosaminoglicanos

GRH: Hormona liberadora de Gonadotropina

HE: Hematoxilina Eosina

HOX: Genes homeóticos

IT: Ingeniería tisular

MEC: Matriz extracelular

PAF: Factor activador de plaquetas

PAS: Acido Peryódico de Schiff

PBS: Buffer fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Proteoglicanos

RER: Retículo endoplásmico rugoso

SDS: deoxicolato de sodio

SIM: Sustancia inhibidora Mülleriana

SLRP: Pequeños proteoglicanos ricos en leucina

TGF-  $\beta$ : Factor transformante de tipo beta

TU: Trompa uterina

UIA: Unión istmo ampular

UIU: Unión istmo uterina

Wnt: Wingless/integrated

# ÍNDICE

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	14
1. GENERALIDADES DE LA TROMPA UTERINA HUMANA.....	16
1.1 Embriología de la trompa uterina humana.....	16
1.2 Anatomía de la trompa uterina humana.....	19
1.3 Histofisiología de la trompa uterina humana.....	21
2. MATRIZ EXTRACELULAR DE LA TROMPA UTERINA.....	29
2.1 Matriz extracelular (MEC), composición y clasificación.....	29
2.2 Componentes fibrilares de la matriz extracelular de la trompa uterina...33	
2.3 Componentes no fibrilares de la MEC de la trompa uterina.....	39
3. PATOLOGÍAS DE LA TROMPA UTERINA.....	43
3.1 Anomalías congénitas de la trompa uterina.....	44
3.2 Patología neoplásica de la trompa uterina.....	45
3.2.1 Neoplasias benignas.....	45
3.2.2 Neoplasias malignas.....	46
3.2.3 Cáncer de ovario y su relación con la trompa uterina.....	48
3.3 Endometriosis tubaria.....	48
3.4 Embarazo ectópico tubario.....	46
4.- INGENERÍA TISULAR DE LA TROMPA UTERINA.....	52
4.1 Generalidades de la ingeniería tisular.....	52
4.2 Composición de los tejidos artificiales.....	53
4.2.1 Células.....	53
4.2.2 Biomateriales.....	56
4.2.3 Factores de crecimiento.....	60
4.3 Estrategias de la ingeniería tisular.....	60
4.4 Ingeniería tisular de la trompa uterina.....	61

4.4.1 Células madre del aparato reproductor femenino.....	65
OBJETIVOS.....	68
2.1 Objetivo general.....	69
2.2 Objetivos específicos.....	69
MATERIAL Y METODOS.....	70
3.1 Obtención de muestras biológicas.....	71
3.2 Análisis histológico.....	74
3.2.1 Procesamiento de muestras.....	74
3.2.2 Análisis histoquímico de la matriz extracelular.....	76
3.2.3 Análisis inmunohistoquímico de la matriz extracelular.....	80
RESULTADOS.....	84
4.1 Evaluación de la estructura general de la trompa uterina.....	85
4.2 Caracterización histoquímica de los componentes de la MEC.....	88
4.2.1 Caracterización de los componentes fibrilares.....	88
4.2.2 Caracterización de los componentes no fibrilares.....	94
4.3 Caracterización inmunohistoquímica de los componentes de la MEC....	96
4.3.1 Distribución tisular de las fibras colágenas.....	96
4.3.2 Distribución tisular de los proteoglicanos.....	100
4.3.3 Tabla de resumen de resultados .....	108
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES.....	119
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	123
ANEXO 1.....	135
Aprobación del comité de ética.....	136

# **RESUMEN**

La trompa uterina (TU) es un órgano tubular del sistema reproductor femenino que conecta el espacio peri-ovárico con la cavidad uterina y desempeña funciones fundamentales del proceso reproductivo. Sin embargo, existe escasa información sobre la composición y función de las moléculas que componen la matriz extracelular (MEC) de la TU en la especie humana. La MEC es un complejo supramolecular sintetizado por células, el cual está restringido a 2 compartimientos: membranas basales y espacios intersticiales. Las moléculas de la MEC no solo juegan un rol estructural importante, sino que además son fundamentales para el crecimiento celular, supervivencia, y diferenciación en todos los tejidos biológicos. En este contexto, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue establecer los patrones estructurales y arquitecturales, histoquímicos e inmunohistoquímicos, de los componentes fibrilares (colágenos I, III y fibras elásticas) y no fibrilares (decorin, biglican, fibromodulin, versican, glicoproteínas) de la MEC de la TU humana, en las distintas fases del ciclo menstrual para su utilización como modelos bioestructurales aplicables en protocolos de ingeniería tisular. Los resultados de este estudio muestran una amplia distribución de colágeno I y III en el estroma de la TU. En la mucosa, existe una inmunomarcación positiva para versican y fibromodulin en la superficie epitelial apical, mientras que decorin y fibromodulin fueron observados en la lámina propia. Versican y decorin fueron advertidos en el estroma de la capa muscular, en cambio todos los proteoglicanos estudiados fueron encontrados en la serosa. Curiosamente, biglican principalmente estuvo restringido a la pared de los vasos sanguíneos de diverso calibre, tanto de la capa serosa como muscular. Además, se observó una marcación positiva para colágenos, decorin, versican y fibromodulin en fascículos

nerviosos periféricos. La distribución diferencial de estas moléculas de las MEC en diferentes capas de la TU podría estar relacionada con funciones estructurales y biomecánicas específicas necesarias para un transporte oviductal, fecundación exitosa y etapas tempranas de la embriogénesis. Sin embargo, son necesarias investigaciones futuras mediante técnicas de biología celular y molecular para dilucidar el rol de las moléculas de la MEC de la TU en condiciones normales y patológicas. En relación a la ingeniería tisular (IT) de la TU humana, no existen estrategias definidas para la generación de sustitutos para la reparación o reemplazo de este órgano. En este contexto, nuestros resultados proveen parámetros morfológicos, celulares, histoquímicos e inmunohistoquímicos necesarios para la construcción de sustitutos de TU por diversas estrategias de IT.

# **INTRODUCCIÓN**

La construcción de tejidos artificiales viables de naturaleza biológica equivalentes a los tejidos y órganos del cuerpo humano, objeto último de la IT constituye actualmente una de las alternativas más importantes a los problemas que genera el trasplante en algunas zonas y a la imposibilidad de llevar a cabo un trasplante en algunas otras [1, 2]. En relación a la IT de la TU humana, no existen estrategias definidas para la generación de sustitutos para la reparación o reemplazo de este órgano. No obstante, la estructura de la TU puede ser afectada por diversas patologías que pueden llevar a un daño parcial o pérdida total del órgano y en algunos casos una alteración de la fertilidad [3, 4]. Un área importante para una potencial aplicación de la IT en mujeres es la cirugía reconstructiva del aparato reproductor femenino, sin embargo, existe escasa información al respecto [5].

En el primer apartado de la presente tesis doctoral se explicarán las características anatómicas, histológicas y embriológicas de la TU humana. En un segundo apartado, se describirá la importancia y función del componente fibrilar y no fibrilar de la MEC de diversos tejidos humanos, con especial énfasis en los órganos reproductores femeninos. En un tercer apartado, se señalarán las diversas patologías que pueden alterar u ocasionar una pérdida total de la TU y sus eventuales consecuencias. Finalmente, y antes de exponer los objetivos, dedicaremos el último apartado a describir algunas generalidades de la IT, composición de los tejidos artificiales y el estado de arte de la IT en el aparato genital femenino.

# **1.- GENERALIDADES DE LA TU**

## **1.1 Embriología de la TU**

La determinación sexual de un individuo comienza en el momento de la fecundación cuando el cromosoma Y o el X se unen al cromosoma X ya presente en el óvulo. A pesar de que el sexo genotípico se establece durante la fecundación, el sexo fenotípico macroscópico no se hace manifiesto hasta la séptima semana del desarrollo [6]. Tradicionalmente, se considera que la diferenciación del fenotipo sexual comienza en las gónadas y progresa mediante la influencia (hormonal) que estas ejercen sobre el sistema de conductos sexuales (Fig.1). En relación a la determinación sexual secundaria, la ausencia del cromosoma Y, desemboca en desarrollo del primordio de la gonada hacia ovario. Los ovarios producen estrógeno, una hormona que permite el desarrollo de los conductos de Müller (conductos paramesonéfrico) hacia útero, trompas uterinas, y extremo superior de la vagina [7].

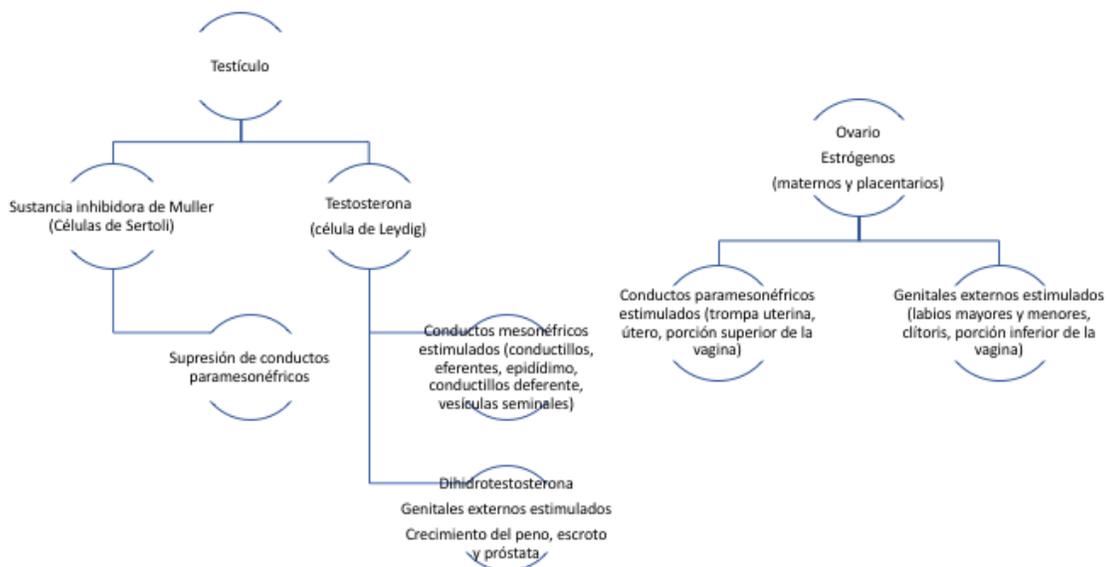


Fig.1 Influencia de las glándulas sexuales sobre la diferenciación sexual futura [7].

Los embriones masculinos y femeninos tienen inicialmente 2 pares de conductos genitales: los conductos mesonéfricos y los paramesonéfricos. Sin embargo, en embriones que poseen ovarios, los conductos mesonéfricos involucionan a falta de testosterona y se desarrollan conductos paramesonéfricos por ausencia de la sustancia inhibidora Mülleriana (SIM) [8]. Los conductos paramesonéfricos aparecen como una invaginación del epitelio superficial en la cara anterolateral de la cresta urogenital, la cual se origina a partir del mesodermo intermedio [6, 7]. Se ha descrito que la formación inicial de los conductos paramesonéfricos depende de las señales de Wnt. De alguna forma, Wnt-7a participa en el mantenimiento de la expresión de una secuencia de genes Hox que están extendidos por el aparato genital femenino [6]. En esta línea, Hoxa-9 se

expresa en las trompas uterinas, Hoxa-10 en el útero, Hoxa 11 en el útero y cérvix y Hoxa-12 en la parte superior de la vagina [6]. Los conductos paramesonérficos se convertirán en los conductos genitales femeninos principales (Fig. 2). Al comienzo se observan 3 porciones en cada conducto [7]: I) una porción craneal vertical que desemboca en la cavidad abdominal; II) una porción horizontal, que cruza el conducto mesonérfico, y III) una porción caudal vertical que se fusiona con el correspondiente del lado opuesto. Después de que se produce el descenso del ovario las dos primeras porciones se convierten en las trompas uterinas.

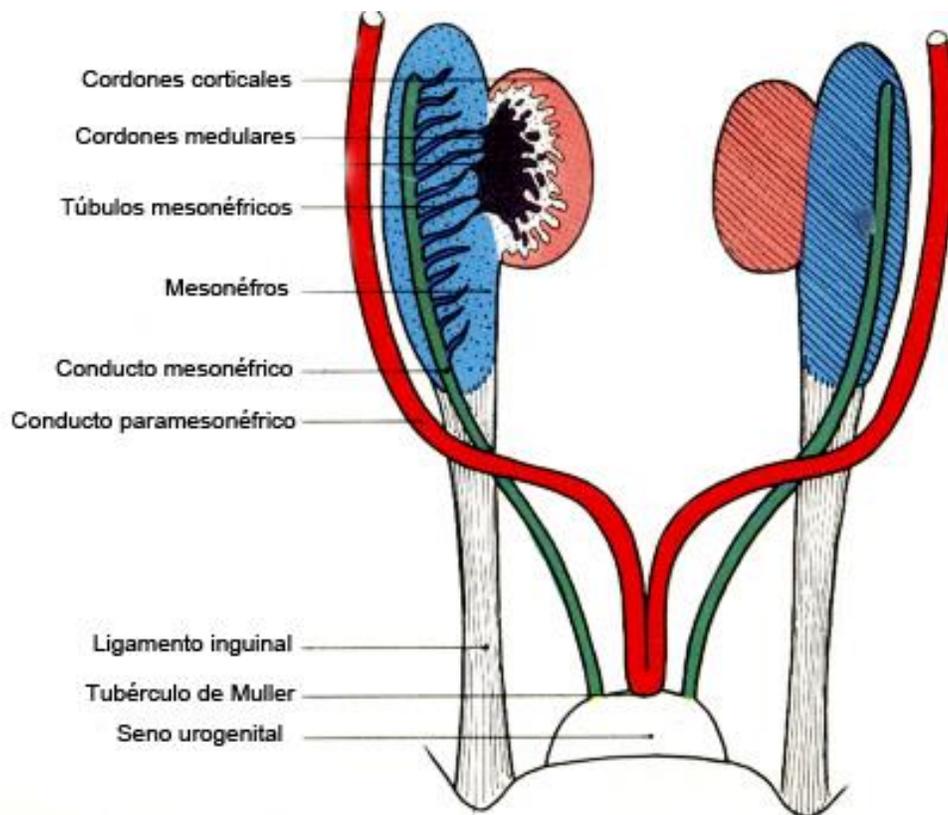


Fig. 2 Conductos de Müller (paramesonérfico) y de Wolff (mesonérfico) [9].

## 1.2 Anatomía de la TU

Las trompas uterinas son dos conductos que se extienden a lo largo del borde superior de los ligamentos anchos del útero. La trompa, es un órgano tubular que conecta el espacio peri-ovárico con el útero. Su longitud es de aproximadamente 10 cm y su diámetro externo mide alrededor de 3 mm en el cuerno del útero y aumenta de medial a lateral alcanzando 7- 8 mm. En la trompa uterina se distinguen 4 segmentos (Fig. 3) [10, 11]:

*Infundíbulo:* Es el extremo lateral en forma de embudo que se proyecta más allá del ligamento ancho y recubre el ovario. El extremo libre posee procesos digitiformes que se denominan fimbrias y su longitud varía entre 10-15 mm.

*Ampolla:* Es la porción más voluminosa y larga de la trompa. Mide 7-8 cm de longitud y 7-8 mm de diámetro. Es la parte mas ancha de la trompa.

*Istmo:* Es la porcion más estrecha y mide 3-4 cm de longitud y 3-4 mm de diámetro.

*Porción intramural:* Es el segmento que perfora la pared uterina y mide aproximadamente 1 cm de longitud y 0,5 de diámetro interno.

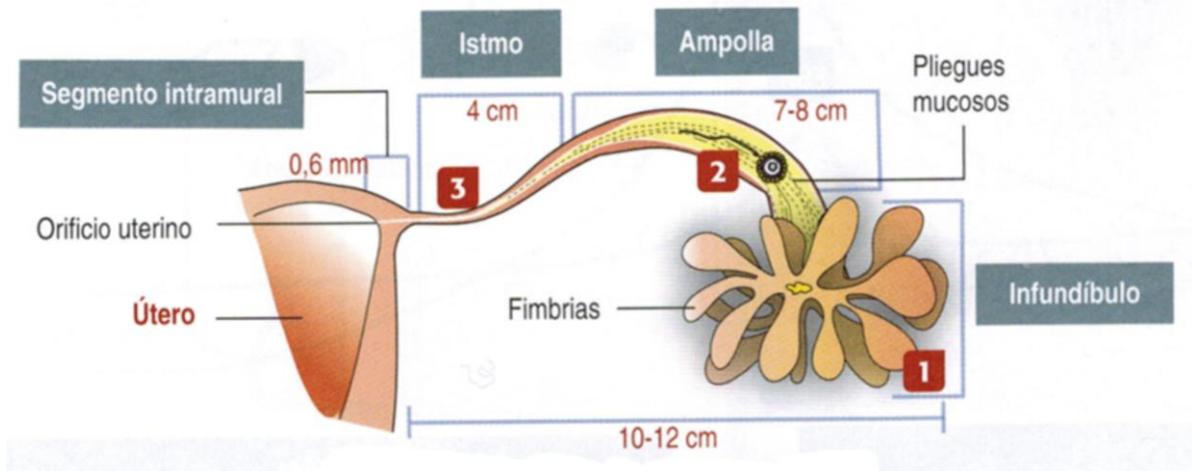


Fig. 3 Segmentos de la trompa uterina [12]. (1):fimbria, (2): ampolla, (3): istmo.

Cabe hacer notar que se distinguen 2 transiciones de un segmento al siguiente que se designan unión istmo ampular (UIA) y unión istmo uterina (UIU) [13]. La inervación simpática es extensa en comparación con la parasimpática, las fibras nerviosas provienen en parte del plexo ovárico y del plexo úterovaginal [14]. Las arterias de la trompa provienen del arco arterial formado por la rama tubárica lateral que es rama de la arteria ovárica y por la rama tubárica que es rama de la arteria uterina (Fig. 4) [11]. Por otro lado, los vasos linfáticos acompañan a los vasos sanguíneos ováricos y drenan en los nodos cercanos a las venas renales derecha e izquierda a los nodos ilíacos comunes y presacros [15].

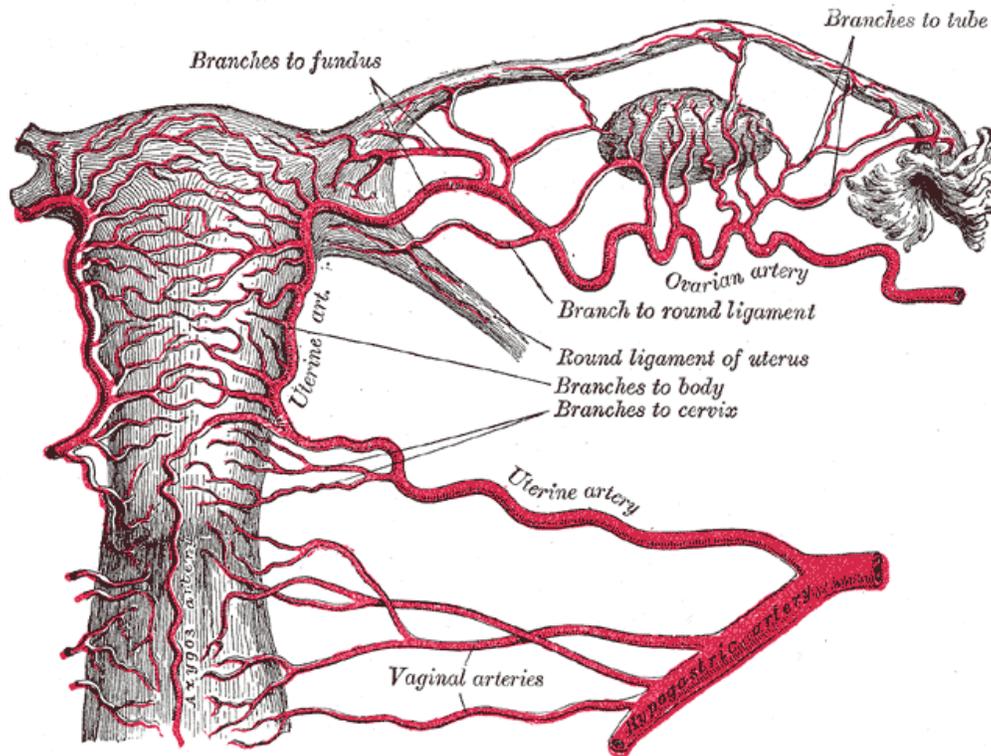


Fig. 5 Irrigación sanguínea de la trompa uterina [16].

### 1.3 Histofisiología de la TU

En un corte transversal podemos reconocer distintas capas que constituyen la TU: mucosa, muscular y serosa. La mucosa presenta un epitelio cilíndrico simple compuesto por 3 tipos celulares: células ciliadas, secretoras e intercaladas (Fig. 5) [15, 17]. Recientemente, ha sido descrito que la célula peg corresponde a un estado de variación de la célula secretora durante el ciclo menstrual [15]. Se ha descrito que el número de células varía en los diferentes segmentos de la TU debido a variaciones durante el ciclo menstrual. En este sentido, las células ciliadas son más prominentes en la mucosa de la TU y predominantes durante la

fase media del ciclo y alcanzan un nadir durante la menstruación [15]. La densidad de las células ciliadas y su altura es aumentada por los estrógenos y disminuida por las progestinas lo cual coincide con las variaciones observadas a lo largo del ciclo menstrual y vida reproductiva de la mujer [18]. Durante la gestación el número de células ciliadas continúa disminuyendo. Se ha señalado que el transporte del ovocito a través de la ampolla depende fundamentalmente de la actividad de las células ciliadas cuyos cilios baten sincrónicamente hacia el útero, mientras que el transporte del embrión por el istmo depende principalmente de la actividad contráctil de la capa muscular la cual presenta un carácter estocástico con un débil sesgo hacia el útero [13]. Por otro lado las células secretoras dan origen al fluido oviductal que se forma por transudado del plasma y secreción activa variando en cantidad, composición y propiedades reológicas, según la etapa del ciclo ovárico [18]. El volumen de fluido es máximo durante la ovulación y mínimo durante la fase lútea.

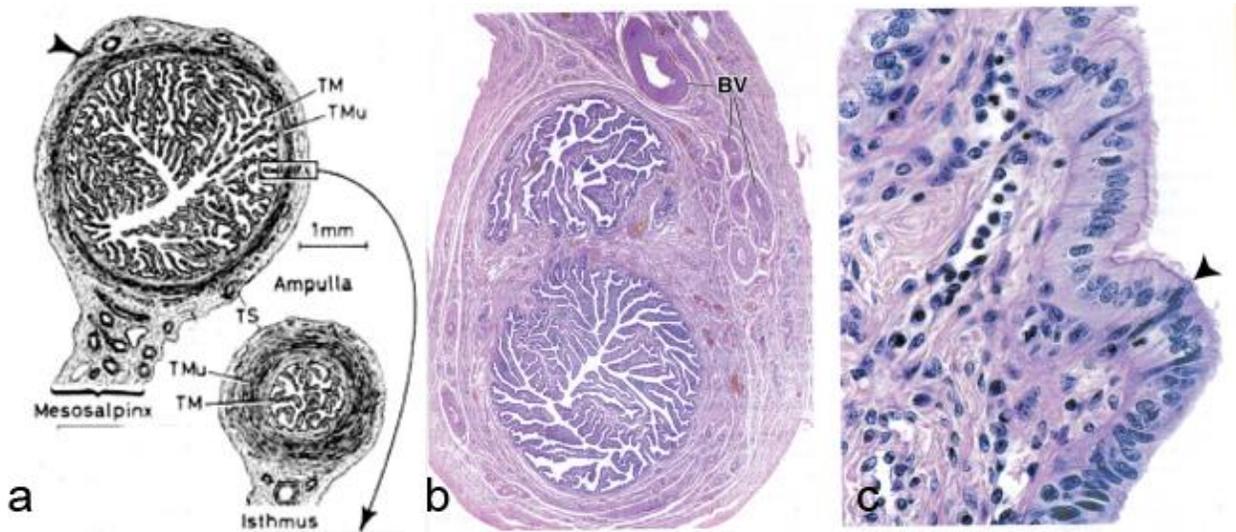


Fig. 5 (a) Esquema de corte transversal de la ampolla e istmo de la trompa uterina. (b-c) Microfotografía de la TU humana. La imagen (b) corresponde a un corte transversal de la ampolla donde se advierte la capa mucosa, muscular y serosa. La imagen (c) corresponde a la mucosa, formada por un epitelio columnar simple con células ciliadas y secretoras (peg) (flecha) [17, 19]. TS: tunica serosa, TM: túnica muscular, Tmu: túnica mucosa, BV: vasos sanguíneos.

Subyacente al epitelio se observa la lámina propia constituida por tejido conectivo laxo que contiene fibroblastos, mastocitos, células linfoides, colágeno y fibras reticulares [20]. En toda su longitud la mucosa presenta pliegues longitudinales relativamente delgados que se proyectan a la luz del órgano (Fig. 6). Estos pliegues son más abundantes y ramificados en la ampolla y se tornan más pequeños en el istmo y quedan reducidos a simples protrusiones en la porción intramural [17].

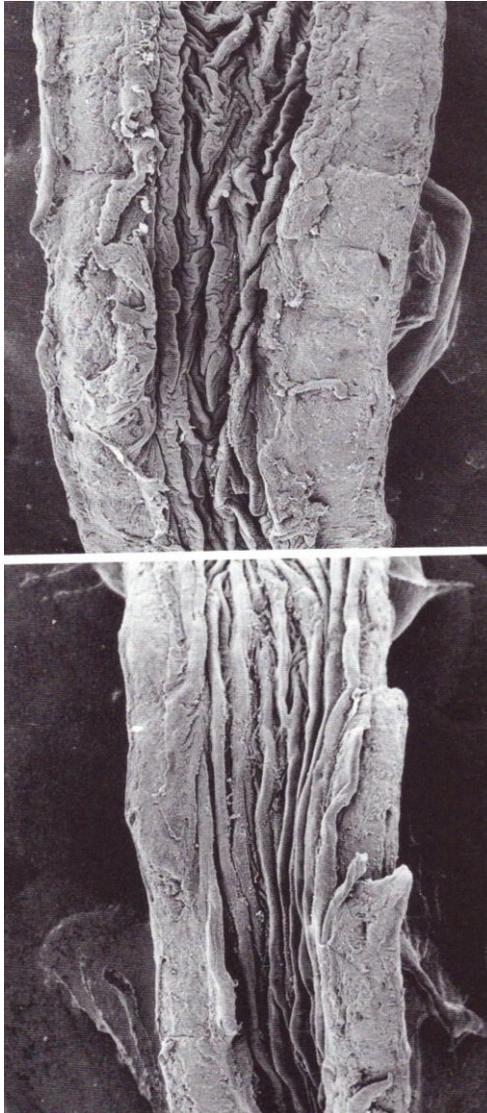


Fig. 6 Microscopía electrónica de barrido de porción istmica de la TU de cerda, nótese los pliegues de la mucosa [21].

Otro aspecto morfo-funcional importante de la mucosa tubaria es la adhesión de los espermatozoides al epitelio de revestimiento. La unión de los espermatozoides al epitelio posterga la capacitación y prolonga la vida fértil del espermatozoide mientras espera que ocurra la ovulación (Fig. 7). Una vez que se

capacitan se liberan, en este sentido se adhieren los que aún no se han capacitado [22, 23]. Los cambios más notorios posteriores a la interacción entre espermatozoides-epitelio son la aparición de una motilidad hiperactivada y un tiempo de latencia menor para experimentar la reacción acrosómica [13].

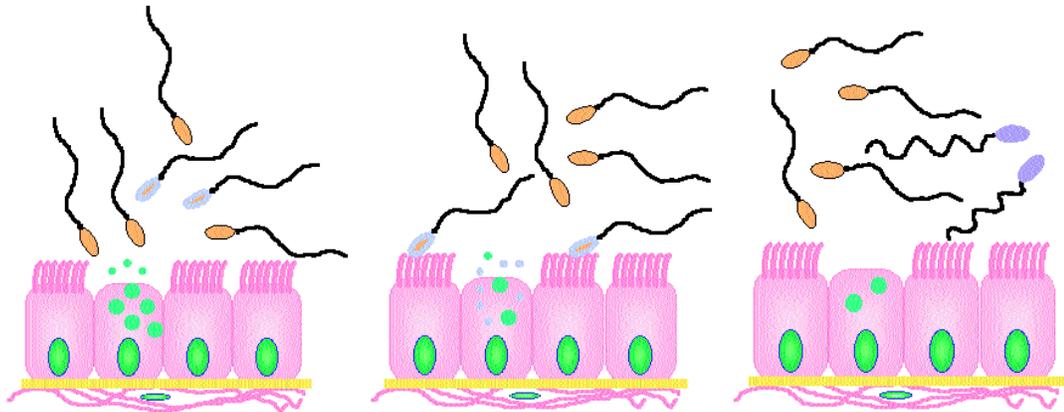


Fig. 7 Esquema de adhesión de los espermatozoides al epitelio oviductal [13].

La capa muscular está compuesta por músculo liso, la cual no forma capas bien definidas, sin embargo los haces más internos tienen una organización circular o con trayecto algo espiral y los más externos son longitudinales (Fig. 8) [24]. Cabe destacar que la capa muscular es delgada en la ampolla y gruesa a nivel de istmo. Entre los haces musculares se encuentra una cantidad variable de tejido conectivo [20]. No se observa una línea clara de separación entre las 2 capas salvo la presencia de tejido conectivo entre las células musculares lisas. Además, en el istmo, cerca de la unión útero-tubaria existe una capa longitudinal interna [15].

La musculatura lisa de la TU exhibe contracciones breves y frecuentes denominadas episódicas y contracciones sostenidas o tónicas. Las primeras son responsables del movimiento pendular del cigoto en el interior de la TU y se generan por la actividad de múltiples marcapasos que cambian permanentemente de ubicación [13]. La propagación de la actividad mioeléctrica a partir de un marcapasos ocurre en ambas direcciones por corto trecho a una velocidad de 1 a 2 mm por segundo [13, 18]. Las contracciones tónicas ocurren al nivel de la unión istmo-ampular y de la unión istmo-uterina y son determinantes de la detención transitoria del transporte que ocurre en estos puntos [13, 18].

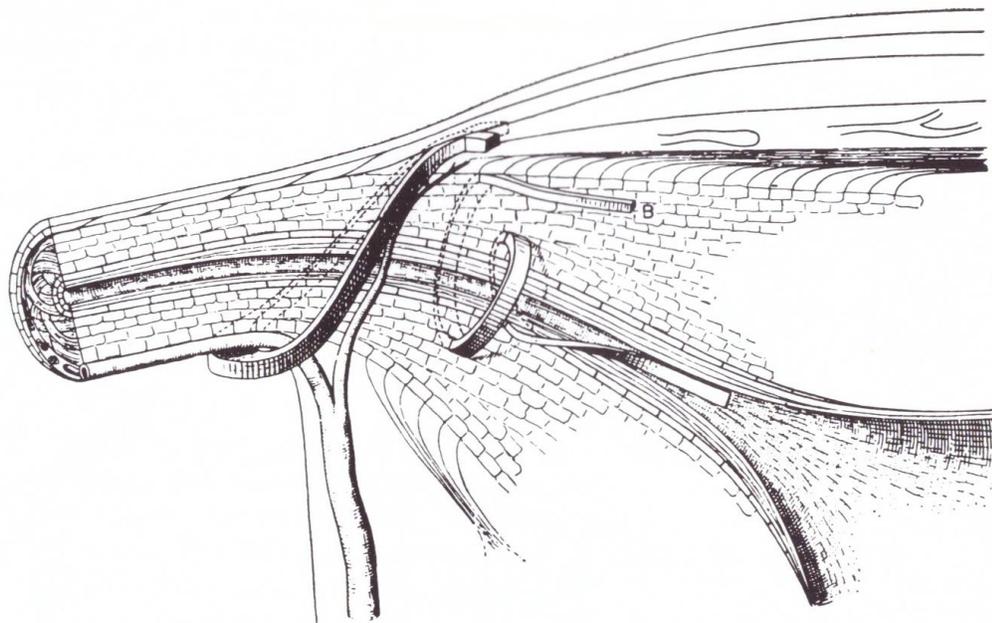


Fig. 8 Organización de las capas de músculo liso de la TU y su relación con el útero [21].

La capa serosa está formada por una lámina constituida por un epitelio simple plano y una capa de tejido conectivo laxo [20]. Subyacente a la serosa y en el interior de la mucosa existen una gran cantidad de vasos sanguíneos que son continuación de los vasos uterinos y ováricos [25, 26]. Se ha descrito que los vasos linfáticos se observan como largas hendiduras tapizadas por un delgado endotelio. Cabe hacer notar que junto a los vasos sanguíneos de la serosa y la porción externa de la muscular transcurren grandes nervios periféricos. La trompa uterina posee inervación simpática y parasimpática y en la parte interna de la capa muscular existe un plexo que proporciona inervación a la muscular y mucosa [26].

Los estudios del transporte tubario en la mujer son escasos. La fase oviductal de transporte se inicia después de la ovulación hasta que la morula pasa a la cavidad uterina. En la mujer tiene una duración de 80 horas aproximadamente [27]. El tránsito del ovocito desde el folículo que ovula hasta el lumen tubario dura entre minutos a horas. Este proceso comprende la ruptura folicular y extrusión del cumulo oóforo, contacto de este con la fimbria y la acción de la corriente mucociliar que lo arrastra hasta el infundíbulo [13]. Durante el transporte ampular, el cúmulo se desplaza hacia adelante y atrás, estos movimientos se explican por contracciones musculares. El transporte a lo largo de la ampolla dura minutos mientras que el transporte a lo largo del istmo dura de horas a días [18]. En este sentido cuando el cigoto llega a la UIA, su avance se detiene por horas o días. Una vez que el cigoto cruza la UIA se inicia su transporte por el istmo, lo cual ocurre también por rápidos movimientos hacia delante y atrás. Cuando es posible observar el fenómeno, se advierte que el cigoto va dentro de un bolo de líquido que se desplaza a alta velocidad por cambios en las gradientes de presión

intraluminal causados por contracciones y relajaciones simultáneas y sucesivas de la capa muscular a lo largo del istmo [13, 28]. En la mujer, el cigoto permanece aproximadamente 70 horas en el extremo ampular de la UIA y luego atraviesa el istmo en 10 horas [13, 27].

El momento y el estado de desarrollo en que el cigoto pasa de la TU al útero varía entre especies, sin embargo, es común que lo haga en estado de mórula 3 o 4 días después de la ovulación [8]. Muchas etapas del proceso reproductivo ocurren en la TU, dichos estadios están sujetas a regulación fisiológica a través de señales provenientes del ovario, de la estimulación sensorial que provee el coito, de los espermatozoides que se adhieren al epitelio, o el propio cigoto o embrión [13, 18].

No obstante, a lo antes expuesto, existe escasa información de los mecanismos de regulación involucrados en el transporte oviductal del ovocito y embrión en la especie humana. Se ha descrito que en la mujer la administración de altas dosis de estradiol y progesterona después de la ovulación no acelera el transporte tubario [13]. Por otra parte, el embrión preimplantacional humano *in vitro* libera PAF (Platelet-activating factor) al medio de cultivo y la mucosa de la TU expresa el receptor de PAF y la enzima PAF acetilhidrolasa, ambos elementos importantes en la acción de PAF. En este sentido, se sugiere que el embrión humano controla el momento en que pasa al útero secretando este agente [13, 29].

Dentro de las funciones generales de la TU podemos mencionar [13]:

- Capta el complejo cúmulo-ovocito.

- Mantiene la viabilidad y ascenso de los espermatozoides al sitio de la fecundación.
- Provee el espacio y ambiente biológico en el cual se produce la fecundación.
- Nutre al huevo mientras es transportado hacia el útero.
- Posiblemente amplifica señales del embrión a la madre.
- Conduce al embrión hacia el endometrio en un momento y estado de desarrollo en sintonía con la sincronización que ambos requieren.

## **2.-MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) DE LA TROMPA UTERINA**

### **2.1 Matriz extracelular, composición y clasificación**

La TU es un órgano tubular que conecta el espacio periovárico con el útero. Tal como se mencionó anteriormente, la pared de la TU está compuesta de 3 capas; mucosa, muscular y serosa [15, 17, 26], donde la MEC juega un rol estructural importante en la función reproductiva [30]. La MEC está compuesta por una serie de moléculas complejas y líquido intersticial. Los componentes se clasifican en un componente fibrilar (colágenas, elásticas y reticulares) y un componente no fibrilar (glicoproteínas y proteoglicanos). La MEC de un órgano está típicamente restringida a 2 compartimientos básicos, la membrana basal y los espacios intersticiales. En este sentido, la MEC consiste en una combinación de proteínas fibrosas embebidas en un gel hidratado de polisacáridos denominado

sustancia fundamental [31, 32] , el cual proporciona estructura y un microambiente idóneo para el normal funcionamiento celular a nivel tisular y orgánico [31, 33, 34]. En décadas anteriores se pensaba que la MEC sólo tenía un rol estructural, sin embargo actualmente se sabe que cumple diversas funciones [20]:

- Modificación de la morfología y funciones de las células.
- Regular su supervivencia.
- Influir en su desarrollo.
- Regular la migración.
- Dirigir su actividad mitótica.
- Asociarse con las células.

En el mismo contexto, existen diversas variedades de tejido conjuntivo formados por los constituyentes básicos ya descritos (células y MEC). Las células que componen mayoritariamente al tejido conectivo son: fibroblastos, mastocitos, macrófagos y leucocitos [12]. La estirpe celular y la composición de la MEC varía de acuerdo a la función del tejido u órgano [17]. En este sentido, destacan los fibroblastos ya que sintetizan proteoglicanos, glicoproteínas y precursores de diferentes tipos de colágeno y elastina [12]. Los fibroblastos poseen un citoplasma abundante con numerosas prolongaciones. Su núcleo es ovoide, grande y poco cromático con una cromatina fina y nucléolo poco prominente [31]. Las denominaciones que reciben estos distintos tipos de tejidos conectivo reflejan su componente predominante o la organización estructural del tejido. Existen 2 tipos de tejido conectivo propiamente dicho: laxo y denso (Fig. 9).

El tejido conectivo laxo soporta estructuras que usualmente están sometidas a presiones y roces pequeños. Es un tejido de amplia distribución en el organismo humano que ocupa espacio que quedan entre grupos de células musculares, que soporta las células epiteliales, que forma capas alrededor de los vasos sanguíneos y que se encuentra en las mucosas y submucosas [31]. Este tejido presenta mayor número de células que de fibras colágenas [12]. Las células más abundantes son los fibroblastos y los macrófagos, aunque también están presentes todos los demás tipos celulares del tejido conjuntivo, además de las fibras colágenas y elásticas [20, 26]. Tiene una consistencia viscosa a gelatinosa, y desempeña un papel importante en la difusión de oxígeno y las sustancias nutritivas desde los vasos sanguíneos pequeños que transcurren por el tejido conectivo, así como también en la difusión del dióxido de carbono y los desechos metabólicos hacia los mismos vasos [17].

El tejido conjuntivo denso se diferencia del laxo en que muestra un componente fibrilar muy abundante y un componente celular escaso [31]. En esta línea, cuando las fibras de colágeno poseen una organización azarosa se denomina tejido conjuntivo denso irregular (no modelado), en cambio cuando las fibras de colágenos se organizan de forma paralela unas con otras se denomina tejido conjuntivo denso regular (modelado) [26]. El tejido conjuntivo denso está adaptado para ofrecer resistencia y protección a los tejidos [31]

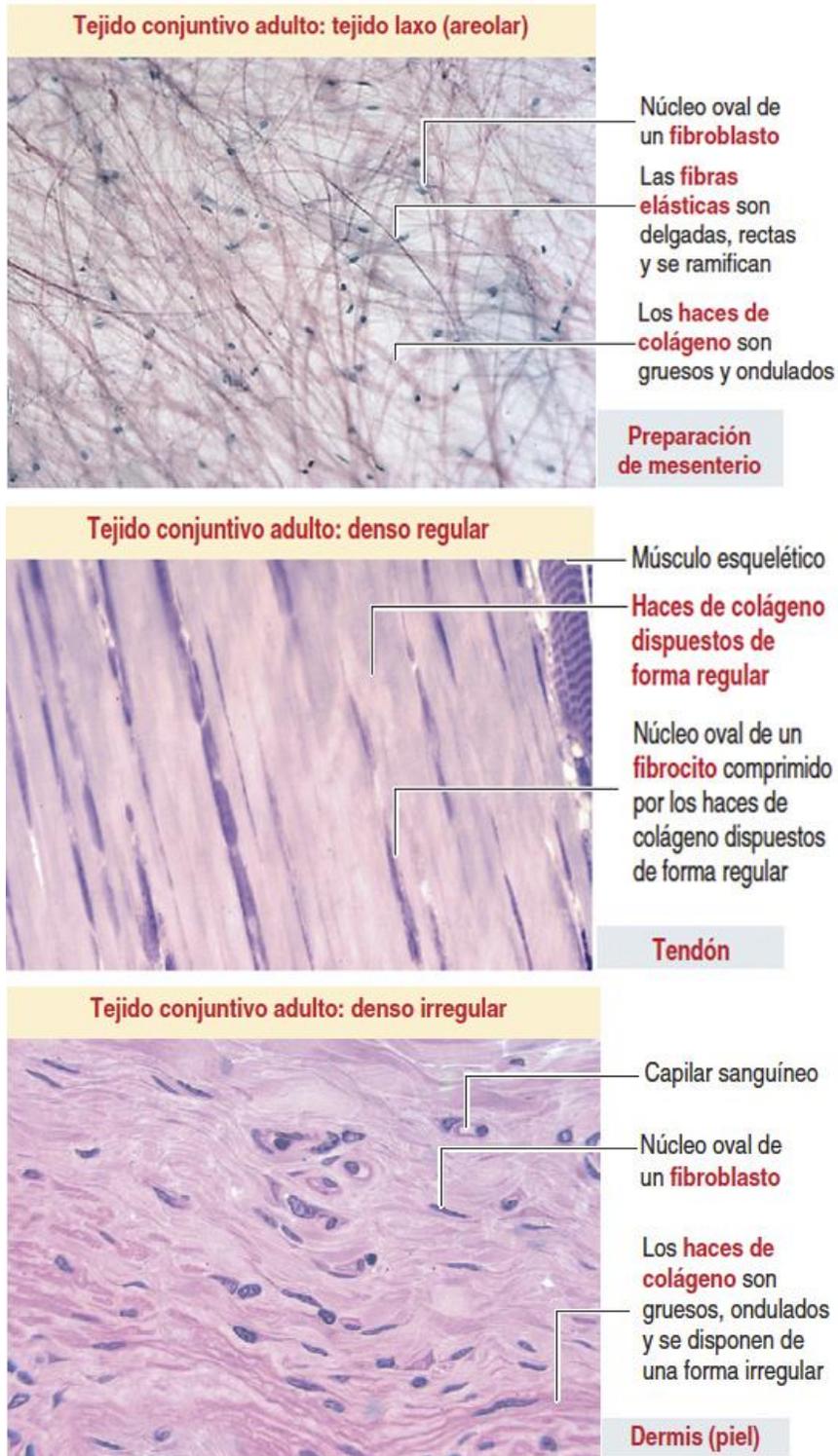


Fig.9 Clasificación de los diversos tipos de tejido conectivo propiamente dicho [12].

## 2.2 Componentes fibrilares de la MEC de la TU

El componente fibrilar de la MEC está compuesto por 3 tipos fundamentales de fibras, las fibras colágenas, elásticas y reticulares.

### *Fibras colágenas*

Las fibras de colágeno están formadas por unidades de tropocolágeno cuya secuencia de aminoácidos de cadenas alfas le permite clasificarlos en al menos 35 tipos de fibras diferentes [20]. Las moléculas de tropocolágeno están formadas por 3 cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas alfa. Cada cadena alfa está compuesta por aproximadamente 1000 aminoácidos, cada 3 aminoácidos uno corresponde a glicina, y la mayoría de los aminoácidos restantes son prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina [17, 20]. Esta familia de proteínas es muy importante y corresponde a un 20-25% de las proteínas del organismo [26]. Los diferentes tipos de colágenos se encuentran en zonas diferentes del organismo, donde poseen funciones específicas [15]. Los colágenos son estructuras helicoidales de aproximadamente 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro, las cuales tienen la capacidad de formar fibras [35]. La síntesis del colágeno comienza en el retículo endoplasmático rugoso (RER), donde el precolágeno es sintetizado con un péptido señal y liberado en forma de procolágeno en la cisterna del RER (Fig. 10). El procolágeno está formado por 3 cadenas peptídicas, no contiene péptido señal y se ensambla en una triple hélice. La hidroxilación de los residuos de prolina y lisina tiene lugar en el RER y requiere de la presencia del cofactor ácido ascórbico

(vitamina C). El empaquetamiento y secreción del colágeno suceden en el aparato de Golgi. A continuación, se mencionan 3 procesos que tienen lugar en el espacio extracelular [12]:

1.- Eliminación de los extremos no helicoidales por la enzima procolágeno peptidasa, dando origen al tropocolágeno.

2.- Autoagregación de las moléculas de tropocolágeno que conduce a la formación de fibrilla de colágeno. La lisilo oxidasa cataliza el entrecruzamiento de dichas moléculas.

3.- El entrecruzamiento de las fibrillas de colágeno origina las fibras de colágeno. En este proceso intervienen los colágenos FACIT (IX, XII, XIV, XIX, XXI) y proteoglicanos.

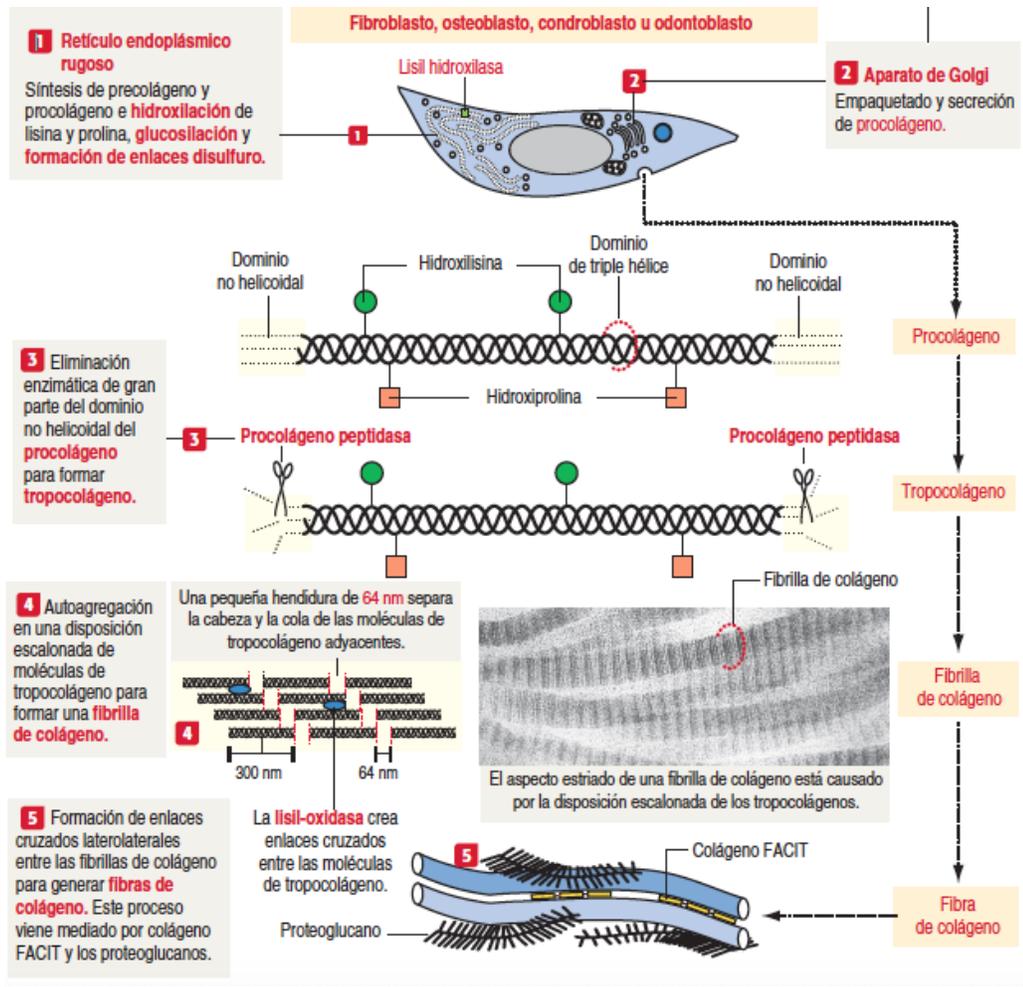


Fig. 10 Etapas de la síntesis de colágeno I [12].

Las consecuencias genótípicas de la mutación en los genes que codifican los colágenos fibrilares (I, II, III y V) indican que la función principal de estas proteínas es proveer alta resistencia a la tracción [3]. Por ejemplo, mutaciones en los genes que codifican COLA1 y COLA2, causan osteogénesis imperfecta y síndrome de Ehlers-Danlos, caracterizado por hiperextensibilidad y fragilidad de la piel, hipermovilidad en articulaciones con o sin anomalías de los huesos [3, 36, 37]. Cabe hacer notar que los colágenos son una de las macromoléculas más

importantes de la MEC ya que determinan gran parte de las propiedades biomecánicas de un tejido [38, 39].

Existen escasos estudios en humanos de la expresión y distribución de moléculas de la MEC de la TU, siendo la mayoría estudios histoquímicos [40-43]. En este sentido, destaca el trabajo de Schultka et al [44] quien estudió la distribución de colágenos (I, III, IV, V, VI) en TU de mujeres entre 32 y 67 años. Los autores concluyen que el tejido conectivo de la TU está compuesto por importantes proteínas estructurales, las cuales forman una complicada arquitectura de la MEC que cambia con la edad. Además, Ohashi et al [45] demostró la expresión de colágeno I en el oviducto de codorniz japonesa por PCR e inmunofluorescencia.

### *Fibras elásticas*

La elasticidad del tejido conectivo se debe principalmente a la presencia de las fibras elásticas, uno de los componentes fibrilares de la MEC. Generalmente, en el tejido conjuntivo son finas largas y ramificadas, pero pueden formar haces más gruesos en los ligamentos o láminas fenestradas [20]. Las fibras elásticas se encuentran rodeadas de sustancia fundamental y se advierten como filamentos alargados que varían entre 1 a 4 micras de diámetro y en algunos ligamentos pueden alcanzar de 10-12 micras [31, 46]. Las fibras elásticas están compuestas por una proteína hidrófoba, la elastina, la cual forma una masa amorfa que progresivamente se rodea por microfibrillas (fibrilinas) para formar una fibra elástica madura [17, 26]. Las microfibrillas que rodean a la elastina se organizan en distintas direcciones, lo cual dependerá del sentido del estiramiento de las

fibras elásticas [17]. La organización que pueden adoptar las fibras elásticas (fibras o láminas) puede alterar las propiedades biomecánicas de los tejidos biológicos [38].

Las fibras elásticas se pueden identificar por diversas técnicas histoquímicas como fucsina resorcina, fucsina adheídica, Verhoeff y orceína [47, 48]. La técnica histoquímica de orceína fue la elegida para identificar las fibras elásticas en la presente Tesis Doctoral.

Las fibras elásticas son sintetizadas por los fibroblastos, así como por las células del musculo liso de vasos sanguíneos y los condrocitos del cartílago elástico [49]. En este sentido, al igual de lo que sucede en la síntesis del colágeno, en la síntesis de las fibras elásticas participan el RER y aparato de Golgi (Fig. 11) [26]. La proelastina la molécula precursora de la elastina, se escinde y secreta en forma de tropoelastina [12]. En el espacio extracelular interacciona con fibrilinas y fibulina 1 para organizar las fibras elásticas cuya agregación origina haces de fibras elásticas [20]. Cabe mencionar que la tropoelastina contiene un aminoácido característico de esta molécula, aunque inusual: la desmosina [17]. La lisilo oxidasa lleva a cabo la oxidación de 2 residuos de tropoelastina para generar un anillo de desmosina que forma enlaces cruzados con las 2 moléculas de tropoelastina [12]. El entrecruzamiento permite distensión y la recuperación de la tropoelastina, como si fuera un hilo elástico.

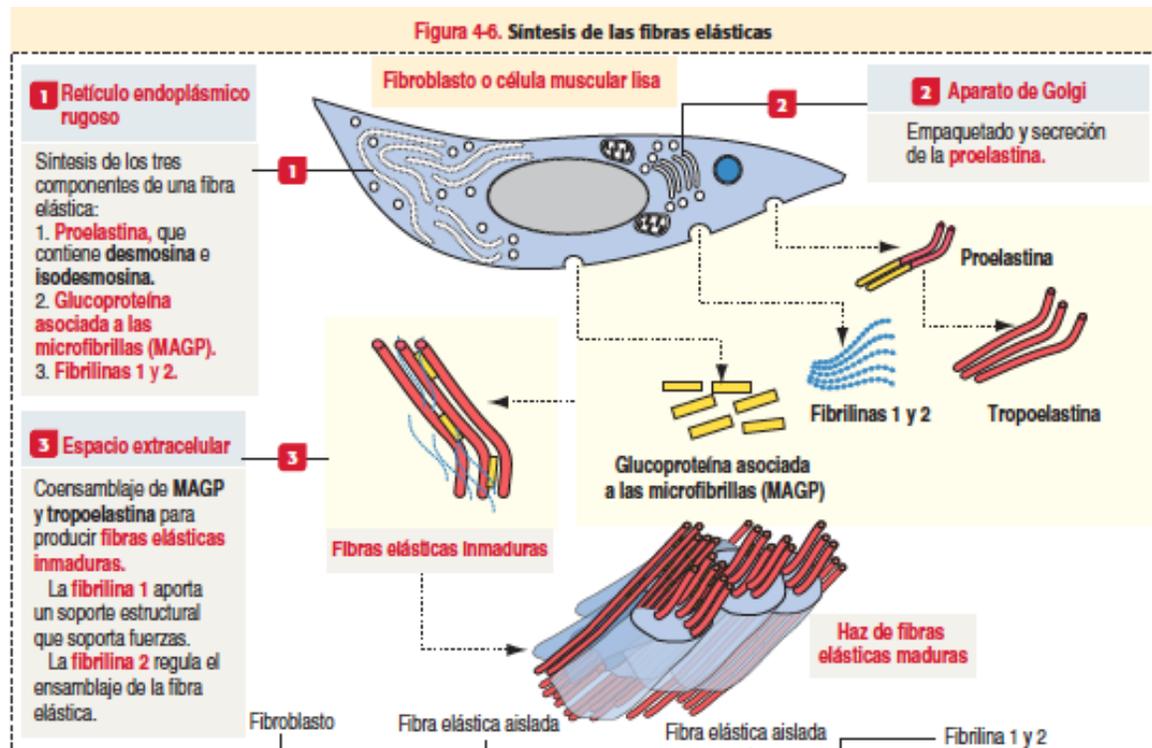


Fig. 11 Síntesis de fibras elásticas [12].

En la presente Tesis Doctoral, el colágeno tipo I y III, así como también las fibras elásticas han sido motivo de estudio tanto por técnicas histoquímicas como inmunohistoquímicas, debido a su amplia distribución en el organismo humano.

### *Fibras reticulares*

Las fibras reticulares están formadas principalmente por colágeno III. Se caracterizan por ser fibras muy delgadas 0,5- 2 micras y forman una red amplia en determinados órganos [31]. Las fibrillas individuales que constituyen la fibra reticular exhiben un patrón de bandas transversales con una periodicidad de 68 nm y generalmente no se organizan en fibras gruesas [17]. Estas fibras no son visibles por técnica de hematoxilina-eosina (H-E) pero se tiñen fácilmente con

técnicas argénticas y método de PAS gracias a su alto contenido de carbohidratos en su superficie [31, 38, 48].

Las fibras reticulares tienen una distribución muy concreta siendo elementos importantes de la MEC del tejido muscular, los órganos hematopoyéticos y linfoides, algunas glándulas endocrinas y en el endoneuro [31, 48].

### **2.3 Componentes no fibrilares de la MEC de la TU**

El componente no fibrilar está compuesto por diversas moléculas que constituyen la sustancia fundamental. La sustancia fundamental es una mezcla de glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos y glicoproteínas, además este complejo se caracteriza por estar altamente hidratado, ser incoloro y transparente [17, 31]. Cabe destacar que la sustancia fundamental rellena los espacios entre las células y fibras de la MEC, y debido a que es viscoso actúa como lubricante y barrera frente a la penetración de microorganismos invasores [31]. En los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina los componentes hidrófilos de la sustancia fundamental se han perdido parcialmente. Además, gran parte de estos componentes no se pueden identificar con tinciones de rutina [17]. De manera, que en la mayoría de los cortes histológicos la falta de aspecto o forma nítida, contrasta con su importancia funcional. La sustancia fundamental consiste en 2 grandes grupos de moléculas: los proteoglicanos y las glicoproteínas. En el caso de los proteoglicanos, estos están compuestos por una cadena polipeptídica central a la cual se unen de forma covalente los GAG. Las glicoproteínas están

constituidas por una proteína globular a la cual se unen cadenas de polisacáridos [31, 50].

Uno de los principales componentes de la MEC son los proteoglicanos, los cuales se definen por su contenido de GAG (Fig. 12). Los GAG son polímeros lineales de disacáridos portadores de residuos sulfato. Estas moléculas controlan las funciones de los proteoglicanos a través del establecimiento de enlaces con componentes de la superficie celular, factores de crecimiento y otros componentes de la MEC [12].

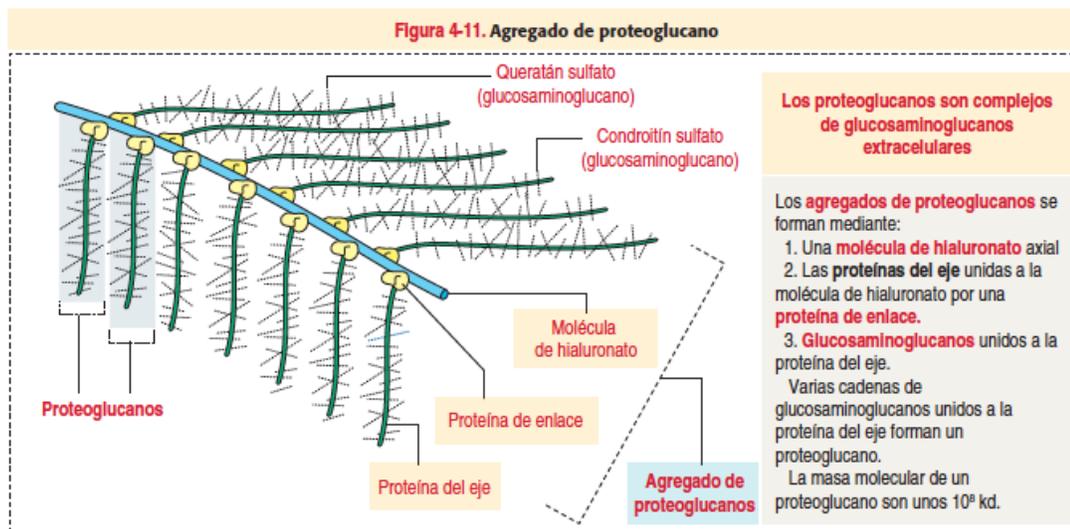


Fig. 12 Estructura general de los proteoglicanos [12].

Dentro de la gran diversidad de proteoglicanos existentes, fibromodulin, biglican y decorin forman un grupo estructural y funcionalmente relacionados de moléculas que participan en de la organización de la MEC y tienen importantes efectos en el comportamiento celular [51, 52]. Estas moléculas son los llamados pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs) y contienen una o más

cadena de GAG de diversa composición química tales como: condroitín sulfato, dermatán sulfato o keratán sulfato [50, 52]. Toda una serie de SLRPs se ha mostrado que interactúan con diferentes tipos de colágeno y reconocen diferentes sitios de la molécula [51]. La interacción de colágenos con SLRPs puede ser crítica en un gran número de procesos biológicos, como la mantención y ensamblaje de la MEC durante el desarrollo, crecimiento y además durante la cicatrización de heridas [52]. Experimentos de *gene ablation* han mostrado que los ratones carentes de SLRPs tienen anomalías de la fibrillogénesis del colágeno, fragilidad de la piel, opacidad de la córnea, osteoporosis o osteoartritis [53-55].

En el caso del proteoglicano biglican, este SLRP está compuesto de una proteína central y 2 cadenas de GAGs de condroitín o dermatán sulfato [50]. Esta molécula está ampliamente distribuida en diversos órganos, tales como; útero [56], placenta [57], pulmones fetales humanos [58] y cartílago [49]. En esta línea, estudios *in vitro* han descrito la expresión de biglican por células endoteliales y músculo liso [59]. Biglican es una molécula que de forma clásica se ha asociado a la fibrillogénesis de las fibras de colágeno [56, 60, 61]. Además, se ha descrito la expresión de esta molécula en trabajos de ingeniería tisular en cartílago elástico bajo condiciones de cultivo y cartílago elástico humano [49].

Decorin es un SLRP compuesto de una proteína central unida a cadenas de GAGs condroitín o dermatán sulfato [62]. Decorin se ha descrito como una molécula promiscua debido a que interactúa con diferentes moléculas de la MEC, moléculas de adhesión y receptores [51]. Además, existe evidencia que decorin y biglican se unen TGF- $\beta$ , modulando su actividad como un mediador de la

inhibición del crecimiento [63-65]. Decorin también está asociado con fibras de colágeno y ha sido descrito que interactúa con colágeno I y VI, soportando la hipótesis que este proteoglicano juega un rol en el ensamblaje de la MEC [66, 67]. Sin embargo, existe evidencia contradictoria sobre si decorin participa en la formación de fibras de colágeno delgadas o gruesas [56, 68, 69].

Fibromodulin es un SLRP, el cual se une a colágeno I, II, VI y IX en *solid phase binding assays* [70]. También, se ha descrito que participa en el proceso de fibrilogénesis del colágeno y puede actuar como reservorio de factores de crecimiento [52, 68, 71]. Es interesante mencionar que Levens et al [72], señaló que la hormona liberadora de gonadotropina (GRH) reduce la expresión de fibromodulin en el miometrio durante la fase proliferativa del ciclo menstrual humano, sugiriendo que esta molécula está bajo influencia de las hormonas ováricas.

Por otro lado, versican pertenece a la familia de las hialectinas, sus importantes propiedades de interacción con otras moléculas, permiten la generación de matrices altamente hidratadas y laxas [73]. Versican interactúa con diversas moléculas de la MEC y juega un rol importante en su ensamblaje [49, 74]. Westergren-Thorsson et al [75] señalan que la estructura de versican, la cual posee cadenas de condroitín/dermatán sulfato y la capacidad de generar agregados con hialuronan, permiten la inmovilización de agua, de modo que se incrementa la presión entre las fibras de colágeno. Observaciones *in vitro* indican que versican inhibe la adhesión célula-sustrato de fibroblastos primarios a colágeno I, fibronectina, vibronectina, y laminina [76].

La interacción entre moléculas de la MEC, factores de crecimiento y el sistema adrenérgico se sugieren como parte de un complejo mecanismo paracrino/autocrino necesario para la fertilización y etapas tempranas de la embriogénesis [77]. La expresión y posibles funciones de moléculas de la MEC han sido estudiados en el útero humano y de otras especies (ratón, rata) [78-80]. La importancia de estas moléculas (colágenos, fibras elásticas y proteoglicanos) radica en que poseen roles clave en procesos de remodelación del útero durante el ciclo menstrual, así como también durante la pre-implantación, implantación y gestación [56, 71, 81]. En este sentido, la presente Tesis Doctoral pretende estudiar la expresión y distribución de moléculas de la MEC (colágenos, fibras elásticas y proteoglicanos) debido a su gran importancia en el proceso reproductivo, así como también su potencial rol en el desarrollo de estrategias futuras de IT para la reparación o reemplazo de este órgano.

### **3.- PATOLOGÍAS DE LA TU**

La estructura y normal funcionamiento de la TU puede verse afectada por diversas condiciones patológicas, las cuales se pueden agrupar de la siguiente manera: anomalías congénitas, neoplasias, endometriosis y embarazo tubario.

### 3.1 Anomalías congénitas de las TU

Las TU provienen de los extremos distales de los conductos paramesonéfricos. Las anomalías congénitas de estas estructuras incluyen orificios accesorios, agenesia completa segmentaria de la trompa y varios vestigios quísticos embrionarios [82]. Los vestigios del conducto mesonéfrico en la mujer incluyen unos cuantos túbulos ciegos en el mesoovario el denominado epoóforo y otros semejantes junto al útero en forma global llamado paraoóforo [82].

El quiste paratubárico es la alteración primaria que más afecta a las TU, mide entre 0,5 a 1 cm de diámetro, de paredes translúcidas, puede ser originadas de estructuras derivadas de los conductos paramesonéfricos en cuyo caso está revestido de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, o de estructuras mesonéfricas en donde se encuentra revestido por un epitelio casi sin células ciliadas y una capa muscular más gruesa [18]. Los que se producen como remanentes del conducto paramesonéfrico ocurren más comúnmente dentro del ligamento ancho. Aunque este tipo de quiste es poco común, raras veces causan síntomas y generalmente son diagnosticados accidentalmente. Los síntomas se manifiestan cuando crecen en forma excesiva, generando hemorragia por ruptura o torción [83]. La torsión es rara debido a su localización; sin embargo, si esta ocurre, frecuentemente están involucrados el ligamento infundibulopélvico y el ovario ipsilateral [84].

## **3.2 Patología neoplásica de la trompa uterina**

La patología neoplásica que afecta a la TU puede ser benigna o maligna, y en relación a su origen, las neoplasias malignas pueden ser primarias o metastásicas.

### ***3.2.1 Neoplasias benignas***

Las neoplasias de este tipo son raras en las TU. El tumor adenomatoide es el tumor benigno más frecuente de las TU y se ubica en la serosa o inclusive en la capa muscular. Está constituido por células mesoteliales dispuestas en un patrón sólido adenomatoide o pseudovasculares [18]. Histológicamente, el tumor se compone de canales, tubos o espacios pseudoglandulares, algunos de ellos dilatados, cubiertos por células aplanadas o cúbicas, así como nidos sólidos o hileras de células redondeadas ricas en citoplasma [85].

Los leiomiomas de la TU son poco comunes y se originan del músculo liso de la capa muscular, del ligamento ancho y de los vasos sanguíneos [82]. Es interesante mencionar que en raras ocasiones aparecen otras neoplasias benignas, pero se ha descrito la presencia de hemangiomas, lipomas, condromas, adenofibromas, cistadenofibromas, angiomiolipomas y tumores de origen nervioso [82].

### **3.2.2 Neoplasias malignas**

El carcinoma de TU comparte varias características clínicas con el cáncer ovárico epitelial. En este sentido, son comparables los factores de riesgo, los tipos histológicos, la estadificación quirúrgica, el patrón de diseminación, el tratamiento y pronóstico [18, 82]. Para considerarse un carcinoma primario de la TU, el tumor debe localizarse a simple vista dentro de la TU o su fimbria, no obstante el ovario y útero no deben contener carcinoma [18, 82].

### **3.2.3 Cáncer de ovario y su relación con la TU**

El cáncer de ovario es la principal causa de muerte por neoplasias ginecológicas y la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres en los Estados Unidos. El subtipo histológico más común y letal del cáncer epitelial de ovario es el carcinoma seroso de alto grado (CSAG), que generalmente presenta manifestaciones clínicas cuando se encuentra en una etapa avanzada. Se ha señalado que el CSAG puede estar asociado con mutaciones BRCA1 y BRCA2 [86]. Tradicionalmente, se ha descrito que el CSAG se origina a partir de la proliferación de células epiteliales ováricas [87]. Sin embargo, actualmente se ha descrito que la mayoría de los cánceres ováricos se originan en el epitelio de la TU por descamación de sus células tanto en mujeres de alto riesgo como en la población general [86]. En este sentido, Cheng, Heinegard [62] señala la presencia de un nicho de células madre en la zona de transición entre el epitelio

ovárico y tubárico que podrían estar involucrada en el origen del cáncer ovárico. La tasa de acumulación de mutaciones puede estar influenciada por la menstruación retrógrada, con paso a lo largo de la TU de la sangre menstrual que contienen citocinas inflamatorias, daño y reparación causado por la ovulación, por la presencia de agentes infecciosos o irritantes, o por pérdida o ausencia de genes BRCA-1 y BRCA-2 [88] (Fig. 13). Los carcinomas intraepiteliales tubáricos serosos pueden evolucionar al cáncer ovárico o peritoneal. Como resultado, la salpingectomía profiláctica con conservación de los ovarios se ha convertido en una práctica cada vez más común para las mujeres pre-menopáusicas para reducir el riesgo de esta patología, pero sacrificando la TU y su importante rol en la reproducción. Es preciso mencionar que la pérdida del órgano actualmente no dispone de un tratamiento para recuperar dicha función, lo cual supone un desafío importante, el cual podría ser abordado por la IT.

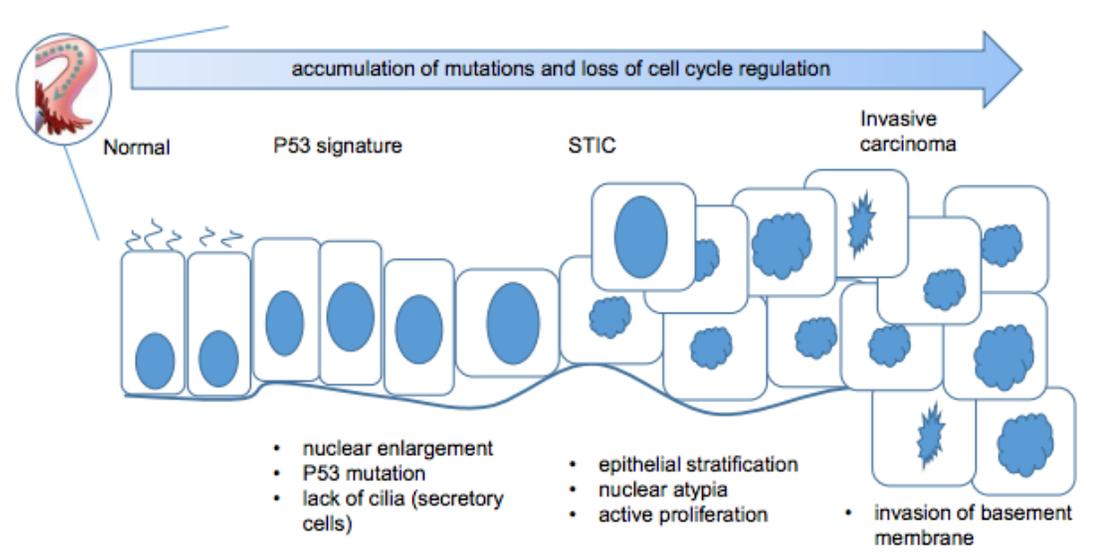


Fig. 13 Causas de alteración celular en el epitelio de la TU [88].

### **3.3 Endometriosis tubaria**

La endometriosis es una patología en la que se desarrolla endometrio ectópico fuera de la cavidad uterina. Esta alteración afecta a 1 de cada 15 mujeres en edad fértil, con una infertilidad asociada de un 30% [89]. Esta enfermedad corresponde a la presencia de glándulas y estroma endometrial en la TU que comprometen la serosa y causan adherencias hacia los ovarios [82]. El endometrio ectópico sigue respondiendo a la estimulación hormonal cíclica, con fases de proliferación y degradación con hemorragia [18]. El tejido endometrial al crecer en localizaciones anormales, estimula la fibrosis y puede producir adherencias entre órganos vecinos. Los síntomas clínicos son dolor pélvico cíclico, dismenorrea e infertilidad [89]. El tratamiento endocrino para regular el crecimiento endometrial suele ser eficaz.

### **3.4 El embarazo ectópico tubario**

Un embarazo ectópico o extrauterino es definido como un embarazo implantado fuera de la cavidad uterina, aproximadamente en un 98% de los casos la implantación es tubaria [90-92]. En los países en vías de desarrollo, la incidencia es mucho más alta, en este sentido 1 de cada 10 mujeres con diagnóstico de embarazo ectópico tubario mueren por esta condición [93]. El

embarazo tubario es frecuentemente encontrado en la práctica ginecológica humana en comparación a otras especies animales. Lo escaso de encontrar embarazos ectópicos tubarios en animales sugiere que la implantación tubaria raramente ocurre, o que el embarazo no sobrevive lo suficiente para alcanzar signos clínicos observables de esta condición [94]. En este sentido, ha sido reportado que la baja frecuencia de embarazos tubarios en primates no humanos puede ser debido a la inhabilidad de la placenta implantada ectópica de mantener el embarazo por un adecuado periodo de tiempo [95]. Sin embargo, las causas y mecanismos de la implantación ectópica en humanos no están claramente definidas [96].

Estudios en ratón, conejo, ratas y ovejas han señalado que los embriones degeneran en el lugar implantado de las trompas obstruidas, ya sea porque el ambiente tubario no es propicio para el desarrollo embrionario secretando factores que previenen la implantación tubaria o quizás el embrión confinado a la trompa es incapaz de llevar a cabo un reconocimiento materno del embarazo [94, 97, 98].

Se han reportado porcentajes variables de embarazo ectópico tubario en diferentes segmentos, y se ha estimado que el segmento oviductal más frecuentemente involucrado es la ampolla (42-70%), y en segundo lugar es el istmo (12-28%) [94, 99, 100]. Los embarazos tubarios terminan entre los 2-3 meses de la implantación por hemorragia, ablación del tejido coriónico o por rotura del oviducto [101]. Además, toda una serie de factores de riesgo han sido identificados que incluyen: tabaquismo, infección por *Chlamydia trachomatis* o *Neisseria Gonorrhoea*, cirugía previa y fertilización in vitro [91, 100, 102, 103].

A pesar del hecho que los embarazos ectópicos ocurren en aproximadamente 1-2% de los embarazos y son la mayor causa de morbilidad y mortalidad materna en el primer trimestre, muy poco se conoce acerca de su etiología y mecanismos involucrados de esta patología casi exclusiva de los humanos [91, 92, 104, 105].

En mamíferos placentados, el útero es receptivo a la implantación del blastocisto durante un espacio-tiempo restringido denominado “ventana de implantación”, cuando el medio ambiente intrauterino es favorable para la implantación del blastocisto [106] (Fig. 14). En ratones, está limitado al día 4 de la gestación [107]. El útero no puede iniciar la implantación antes de este periodo (día 1-3). Inmediatamente después del estado receptivo el útero espontáneamente entra en una fase refractaria (día 5) donde el medio ambiente intrauterino es hostil para la sobrevivencia del blastocisto. De forma similar en humanos, el periodo de receptividad ocurre entre el día 20 y 24 de un ciclo menstrual regular (del día 6 al 10 después del peak de LH) [108]. Estos procesos dinámicos involucran una variedad de genes que incluyen citocinas, factores transcripcionales homeobox, y genes del desarrollo que trabajan juntos con esteroides ováricos para una receptividad uterina específica [108].

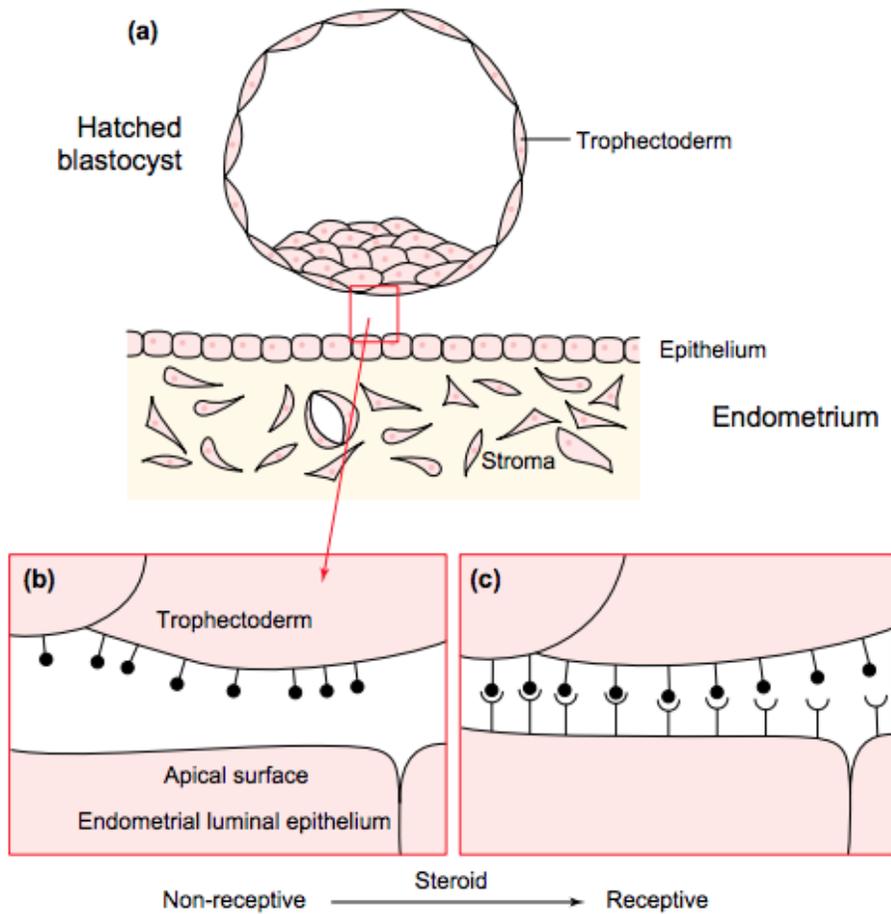


Fig. 14 *Attachment* del blastocisto al epitelio endometrial [109].

Durante la implantación el trofoblasto se adhiere (*attach*) a la superficie apical del epitelio endometrial. Estudios moleculares en humanos y en ratón, y data de modelos experimentales han identificado una serie de moléculas de adhesión que podrían tener un rol en este proceso: integrinas de la familia  $\alpha v$ , trofonina, CD44, cad-11, el tipo H y I, oligosacáridos y heparán sulfato [109]. Después del attachment, la invasión intersticial del trofoblasto ocurre requiriendo un nuevo repertorio de interacciones adhesivas con la matriz extracelular materna, así como también el estroma y poblaciones celulares vasculares.

## **4.- INGENIERÍA TISULAR DE LA TU**

### **4.1 Generalidades de ingeniería tisular (IT)**

La construcción de tejidos artificiales viables de naturaleza biológica equivalentes a los tejidos y órganos del cuerpo humano, objeto último de la IT constituye actualmente una de las alternativas más importantes a los problemas que genera el trasplante en algunas zonas y a la imposibilidad de llevar a cabo un trasplante en algunas otras por falta de donantes [1, 2]. Además, la utilización de tejidos artificiales no sólo es importante como acción terapéutica, sino también como acto paliativo, como lo reportado por Zhang et al [110] en la reconstrucción de defectos maxilofaciales causados por un carcinoma hipofaríngeo [2]. En este sentido, la ingeniería tisular consiste en la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización terapéutica para restaurar, sustituir, o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos [111]. Cabe hacer notar que el término se utilizó por primera vez en 1987 por el Dr. YC Fung en la Universidad de California [111]. La IT integra los descubrimientos de múltiples campos disciplinares, incluyendo ciencias morfológicas, biología celular y molecular, ciencias de los materiales, medicina entre otros, con el objetivo de fabricar tejidos tridimensionales complejos y órganos que pueden servir como implantes [1, 5, 112].

Es interesante mencionar que la construcción de tejidos artificiales además de una opción terapéutica constituye una alternativa para la sustitución de animales

de experimentación en determinadas condiciones con la ventaja de poder utilizar células o tejidos humanos en las investigaciones a desarrollar [113, 114].

Se ha señalado que en Estados Unidos entre los años 2000 y 2001 más de 70 compañías invirtieron aproximadamente 600 millones de dólares para desarrollar nuevos productos vinculados a la IT [1, 115]. En este contexto, se estima que en el 2020 el volumen del negocio vinculado a la IT puede alcanzar una cifra de 200 billones de dólares [1].

## **4.2 Composición de los tejidos artificiales**

Los componentes de la ingeniería tisular comprenden: a) células, b) biomateriales y c) factores de crecimiento; cada uno de estos componentes presentan a su vez características particulares para su utilización.

### **4.2.1 Células**

En primera instancia se debe aislar e identificar una línea celular que sea de fácil multiplicación y que eventualmente satisfaga las necesidades del paciente. El origen y las características de las células utilizadas puede ser diverso, pudiendo utilizarse células autólogas (del paciente) o aloinjertos (de otro paciente) o xenoinjertos (de otras especies) [3]. En este sentido, las células autólogas son consideradas el gold estándar para evitar el riesgo de rechazo inmunológico y evitar los efectos colaterales del uso de drogas inmunosupresoras, sin embargo,

en muchos casos resulta imposible conseguirlas del mismo paciente y se utilizan células de origen alogénico [4].

Lo que hace que las células madre sean diferentes es su potencia, definida como el número de diferentes tipos celulares que una sola célula madre puede dar origen. En este sentido, la potencia puede variar desde una célula unipotencial a una multipotencial. Las células madre unipotenciales o multipotenciales, conocidas como células madre adultas, se encuentran en todos los órganos y son responsables de contrarrestar el desgaste fisiológico [116]. Estas células son una pequeña población de crecimiento lento presentes durante toda nuestra vida, las cuales están en equilibrio entre la auto-renovación y la diferenciación [117].

De acuerdo a la opinión del el *Mesenchymal and Tissue Stem cell Committee de la International Society for Cellular Theraphy*, las células madre mesemquimáticas humanas que son aisladas desde diferentes tejidos por distintos métodos deberían ser designadas como células madre mesenquimáticas estromales multipotentes. Sin embargo, la clasificación debe cumplir algunos criterios mínimos: a) Las células deben adherirse a superficies plásticas cuando son cultivadas en medio de cultivo convencionales en presencia de suero bovino al 10%; b) las células en su superficie deben expresar marcadores de células mesemquimáticas; c) las células deben poder diferenciarse a fibroblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* [118, 119].

A continuación, se resume la clasificación de las células madre de acuerdo a su potencialidad (Fig. 15). La potencialidad representa la capacidad y posibilidades de diferenciación a distintos tipos celulares [3]:

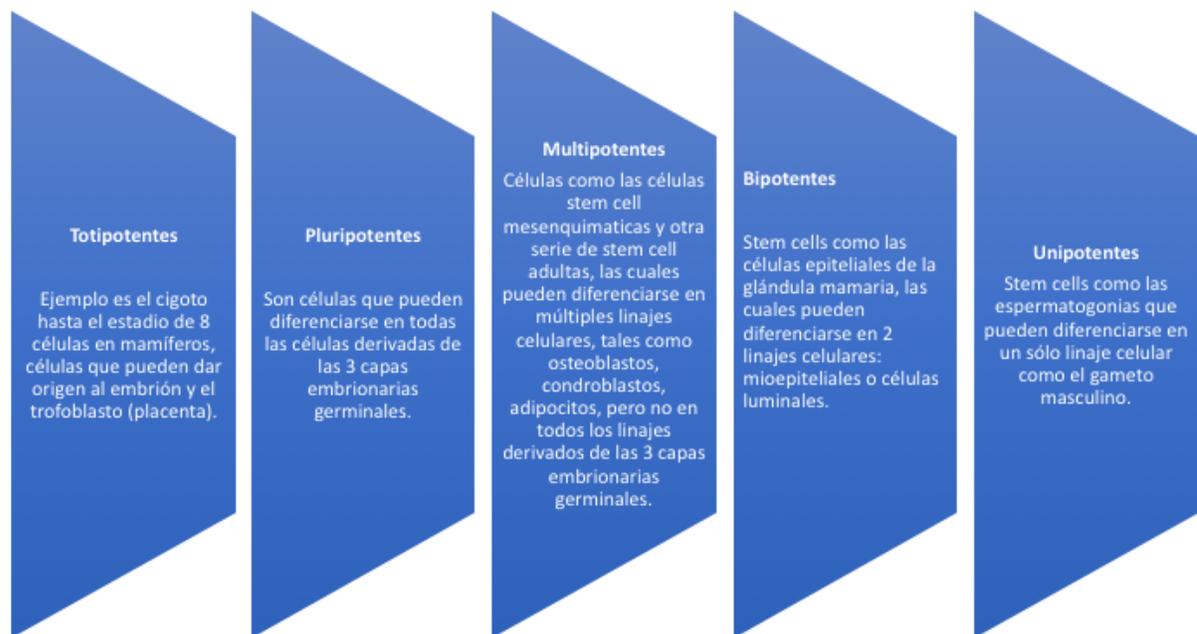


Fig. 15 Clasificación de las células madre de acuerdo a su potencialidad diferenciativa [3].

Además, de acuerdo al estado evolutivo, las células madre se pueden clasificar en embrionarias y somáticas o adultas [3].

- Célula madre embrionaria: Derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocisto (maciso celular interno) y posee la capacidad de generar cualquier célula diferenciada en el organismo.
- Célula madre somática o adulta: Se encuentran en el feto, cordón umbilical y adulto. Corresponde a una célula especializada dentro de la organización de las células de un tejido específico de un organismo ya formado, que está restringida en su capacidad de diferenciación y es capaz únicamente de

generar células del tejido que representa, a las que debe recambiar de forma natural.

También, es interesante mencionar el trabajo de Takahashi y Yamanaka [120], quienes obtuvieron células madre pluripotentes a partir de fibroblastos (células maduras) en condiciones de cultivo introduciendo algunos factores (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4), son las conocidas células iP a las cuales se les augura un importante uso terapéutico. Finalmente, una de las áreas más importantes de investigación en células madre y su aplicación en la IT son la viabilidad y su variación en los diferentes subcultivos, aspecto que incide directamente en su eficacia terapéutica [2, 121-126].

#### **4.2.2 Biomateriales**

En el ámbito de la IT el biomaterial se define como el componente del tejido artificial que actúa como soporte estructural tridimensional y funcional de las células, y como agente facilitador para la acción sobre ellas de factores de crecimiento y señales moleculares, es decir la MEC nativa [2]. Los biomateriales que se utilizan IT para sustituir o imitar la MEC del tejido a reparar pueden ser de origen sintético (ácido poliláctico, ácido poliglicólico) o natural (colágeno I, fibrina) [4]. La utilización de biomateriales en terapéutica debe estar sometida al cumplimiento de toda una serie de indicadores de calidad [3, 127, 128]:

- Biocompatibilidad por el organismo receptor.
- Ausencia de toxicidad o efectos secundarios.

- Ser químicamente estable e inerte (biomateriales no reabsorbibles).
- Facilidad de producción y procesamiento.
- Cumplir con los requerimientos biomecánicos necesarios para llevar a cabo su función en el organismo.

En un tejido construido mediante IT el biomaterial debe tener como actividad básica promover la función y la viabilidad del tejido, es decir facilitar funciones celulares de adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular [1, 2]. Debido a la limitada disponibilidad de fuentes autólogas y alogénicas los investigadores han optado por descelularización de matrices de diversos tejidos. La descelularización preserva la arquitectura de la MEC y minimiza los efectos del rechazo inmune, sin embargo, el uso de agentes descelularizantes puede causar la disrupción de la ultraestructura y la generación componente residuales celulares (ej: ácidos nucleicos), los cuales de no ser removidos durante el procesamiento pueden causar efectos negativos en el huésped. En este sentido, mediante el uso aloinjertos o xenoinjertos como material de partida, es posible tener una MEC viable con las características específicas del tejido [129]. Además, es interesante mencionar que las moléculas de MEC están altamente conservadas entre las especies, de manera que la reacción inmune dependerá principalmente de la presencia de material celular [130]. La eliminación insuficiente de material celular puede provocar una respuesta inflamatoria y alterar el proceso de regeneración, generando eventualmente un rechazo en el huésped [130-132].

Se han utilizado diferentes métodos para descelularizar tejidos, incluidos métodos físicos, químicos y enzimáticos [133]. Sin embargo, aún no se ha

establecido un protocolo estándar confiable [134]. En este contexto, se ha descrito en la literatura que se han descelularizado diferentes tejidos: hígado [135], válvulas cardíacas [134], cornea [136] e intestino [137, 138] por diferentes métodos. La elección del método de descelularización dependerá en gran medida de la naturaleza y la composición molecular del tejido, siendo la composición de la MEC muy importante [139]. No obstante, independiente del método utilizado es muy difícil eliminar todos los componentes celulares sin dañar la ultraestructura y la composición de la MEC [139].

Diferentes tipos de descelularización química han sido utilizados, incluyendo surfactantes (SDS, Triton X-100, SD, CHAPS), ácidos y bases (ácido parácetico, EDTA, entre otros) [140]. Los surfactantes son los agentes descelularizantes más comúnmente utilizados por lo general funcional lisando las células desorganizando la membrana celular de fosfolípidos [141]. Triton X-100 a menudo es utilizado en la descelularización por perfusión en órganos completos [140]. En solución con hidróxido de amonio, remueve completamente todo el ADN y mantiene gran cantidad del colágeno comparado con el tratamiento con SDS (deoxicolato de sodio) [142]. En este sentido, la ultraestructura y propiedades mecánicas fueron bien preservadas siguiendo el protocolo de descelularización [143]. La descelularización química se ha reportado en la literatura como un método eficaz para el tratamiento de diversos órganos y tejidos [134, 136, 137, 139, 140].

Por otro lado, cabe mencionar que Crapo et al [144] menciona criterios cuantitativos para determinar los límites aceptables para la descelularización de un tejido:

- <50 ng de ADN bicatenario (dsDNA) por mg de peso de ECM.
- Fragmento de ADN <200 pb de longitud.
- Falta de material nuclear visible en secciones de tejido teñido con 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) o hematoxilina-eosina.

Por otro lado Phillips et al [139], señalan la necesidad de establecer criterios de evaluación de los tejidos descelularizados incorporando la preservación y/o eliminación de componentes de la MEC. En esta línea, proponen la evaluación de los siguientes parámetros:

- Análisis histológico de colágenos, PG y fibras elásticas con métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos.
- Análisis de la ultraestructura con microscopía electrónica de transmisión para demostrar la preservación y organización del estroma.
- Análisis cuantitativo del contenido de colágeno y GAG con ensayos bioquímicos.
- Análisis de propiedades biomecánicas bajo fuerzas de tensión para demostrar que la descelularización no alteró estas propiedades.

Algunos de los tejidos más utilizados en la regeneración del aparato reproductor femenino son la submucosa intestinal de cerdo, peritoneo y membrana amniótica [4]. No obstante, se carece de información en la literatura sobre la aplicación de protocolos físicos, químicos o enzimáticos de descelularización en la

TU humana y menos aún información sobre la preservación adecuada de los componentes estructurales de la MEC, siendo un campo a investigar.

#### **4.2.3 Factores de crecimiento**

Una amplia variedad de moléculas juega un rol importante en la proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares [3, 111]. Estos elementos son secretados de forma endógena por las células o bien, son el resultado de señales paracrinias. Estas moléculas corresponden a los factores de crecimiento. Cabe mencionar que la adición de factores de crecimiento a células y matrices extracelulares artificiales aumenta el éxito de los tejidos generados mediante IT en comparación con los que no reciben dicha adición [145, 146]. Los factores de crecimiento se pueden incorporar en asociación con el biomaterial, directamente (en solución), o a través del uso de células que tienen la capacidad de sintetizar en el interior del constructo y/o dichos tejidos [147, 148].

### **4.3 Estrategias de la IT**

La elaboración de sustitutos por IT se puede llevar a cabo mediante diversas estrategias o técnicas de biofabricación. A continuación se resumen las más utilizadas [111]:

*IT por inducción:* La construcción de un nuevo tejido se puede llevar a cabo mediante fomentar la inducción del mismo en el seno del propio organismo. Es el

caso de la utilización de factores de crecimiento con el objeto de estimular células madre pluripotentes o células madre progenitoras existentes en la región que se desea crear el nuevo tejido, estimulando su proliferación, diferenciación y distribución en el espacio y tiempo.

*IT por transferencia celular:* Las células son primero aisladas, mantenidas y tratadas en *in vitro* y posteriormente se inyectan en la circulación sanguínea o se implantan en determinadas zonas del organismo para poder suplir la deficiencia estructural y funcional. Un ejemplo de este tipo de estrategia corresponde a transferencia de condrocitos autólogos en patologías articulares.

*IT por elaboración de constructos:* Un constructo es la estructura que resulta de la asociación de los 3 elementos básicos: células, biomateriales y factores de crecimiento. El diseño y la elaboración de constructos por IT para uso clínico debe intentar conseguir: 1) la naturaleza estructural y funcional de los tejidos nativos; 2) los tamaños y formas deseadas; 3) la posibilidad de continuar su desarrollo una vez implantado en el cuerpo; 4) la posibilidad de integrarse completamente en el huésped.

#### **4.4 Ingeniería tisular de la TU**

En el campo de la IT existe escasa información en la literatura sobre estrategias o experiencias utilizadas para el tratamiento de alteraciones de la TU. No obstante, como se comentó anteriormente la estructura y función de la TU puede ser afectada por diversas condiciones patológicas que pueden llevar a un daño parcial o pérdida total del órgano, y la eventual necesidad de reconstrucción

o reemplazo [3, 4]. Un área importante para una potencial aplicación de la IT en mujeres es la cirugía reconstructiva genital [5]. Cabe mencionar que las malformaciones congénitas o adquiridas pueden afectar de forma adversa la anatomía del aparato genital femenino, teniendo como consecuencia en muchos casos la alteración de la fertilidad. Las malformaciones genitales tienen una incidencia de 0,5–1 % en la población femenina general [149]. En este contexto, se han realizado algunos esfuerzos mediante IT para restaurar la anatomía nativa de la vagina, permitiendo la función sexual y mejorando la calidad de vida de las mujeres [5, 150, 151]. Destaca el estudio llevado por Dorin et al [152] quienes demostraron una estrategia de reemplazo vaginal en un modelo autólogo en conejas. En este modelo, los investigadores aislaron células epiteliales vaginales y músculo liso que fueron trasplantados a una matriz tubular hecha de ácido poliglicólico. Posteriormente, implantaron el constructo en conejas y después de 6 meses los autores demuestran la formación de un tejido comparable al tejido vaginal nativo en histoarquitectura y función [152].

Es importante destacar, que cuando se carece de tejido genital nativo, la reconstrucción podría ser realizada eventualmente por otros tejidos u órganos autólogos de otras localizaciones anatómicas (segmentos gastrointestinales, piel, mucosa de diversas partes del cuerpo), de origen alogénico, tejido o matrices heterólogas o xenogénicas (colágeno bovino o porcino), y por materiales sintéticos (silicona, poliuretano, teflón) [3, 4].

Cabe hacer notar, que a menudo se prefiere trasplantar los órganos o tejidos frescos porque mantienen las características e integridad de la MEC y la complejidad celular que existe en el tejido nativo [4, 5]. El origen de estos tejidos

puede ser alogénico o autólogo. Generalmente, se prefiere el tejido autólogo para evitar el rechazo inmunológico y los efectos adversos de la terapia inmunosupresora [4, 5]. No obstante, existe una limitada disponibilidad de fuentes autólogas y alogénicas de manera que en las últimas 2 décadas se ha optado por descelularización de matrices de diversos tejidos. La descelularización mantiene la integridad de la MEC y minimiza los efectos del rechazo inmune, sin embargo, los diferentes métodos poseen algunas limitaciones [129, 134].

Como se ha comentado con anterioridad, los biomateriales deben ser compatibles, promover la interacción celular y el desarrollo del tejido, y poseer determinadas propiedades biomecánicas [3]. En la literatura se ha señalado que 3 clases de biomateriales han sido utilizados en ingeniería del tejido genitourinario: materiales naturales (colágeno, alginato, fibrina-agarosa), polímeros sintéticos (ácido poliglicólico, ácido poliláctico o caprolactona), y matrices acelulares o descelularizadas (submucosa de vejiga, submucosa de intestino) [3-5, 153].

Cabe mencionar que una de las principales restricciones de la ingeniería tisular es que las células no pueden ser implantadas en un volumen que exceda los 3 mm<sup>3</sup> debido a las limitaciones de la nutrición tisular e intercambio de gases [154]. Para mejorar la vascularización del tejido se han utilizado 3 enfoques [3]:

- Incorporación de factores angiogénicos en la bioingeniería del tejido.
- Sembrar células endoteliales con otros tipos celulares en la bioingeniería del tejido.
- Prevascularización de la matriz anterior al sembrado de células.

De forma concreta, la infertilidad secundaria a una alteración de estructural o funcional de la TU podría ser abordada desde la IT en 2 grandes categorías: 1) Trasplante de órganos frescos o criopreservados en un huésped (Fig.16); 2) abordaje desde la IT que utiliza la combinación de células, factores de crecimiento y biomateriales que aprovechan la capacidad del organismo de regenerar y reparar los órganos reproductivos (Fig. 17).

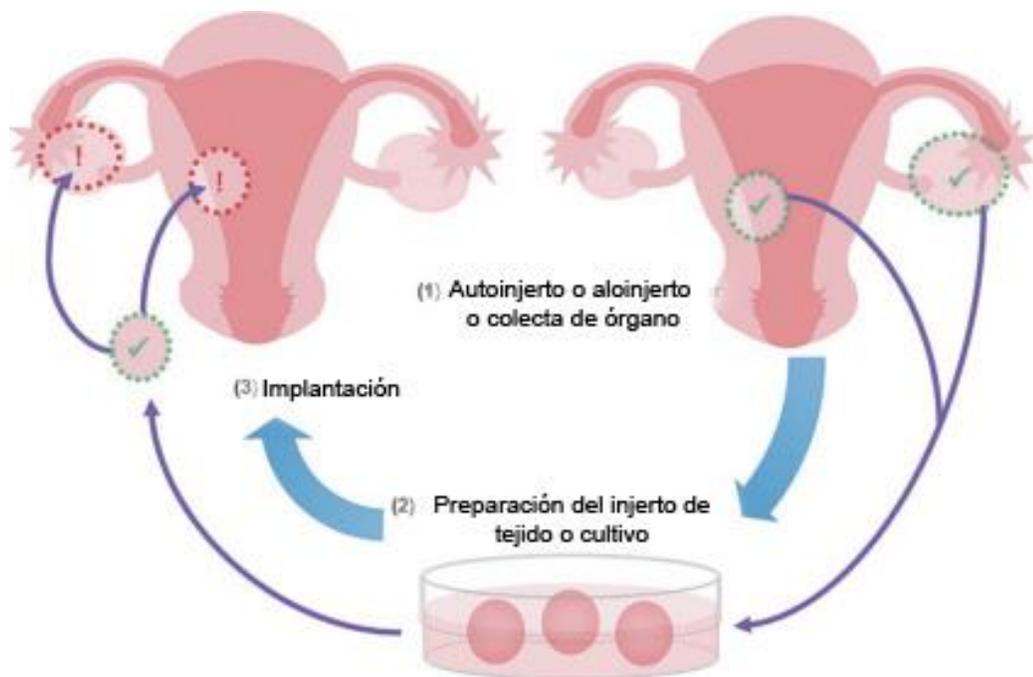


Fig. 16 Esquema que representa el transplante de tejido/órgano de un autoinjerto y aloinjerto [4].



Fig. 17 Fabricación de injerto por ingeniería tisular para la reparación de órganos reproductores femeninos integrando biomateriales, células y señales bioquímicas [4].

#### 4.4.1 Células madre del aparato reproductor femenino

Las células madre poseen un enorme potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos para un amplio espectro de patologías. El aparato reproductivo femenino requiere una rápida y bien regulada reconstitución de una gran variedad de tipos celulares y tejidos, aspecto que sugiere la existencia de un gran número de células madre [118]. Un amplio número de células son clasificadas como células madre. La propiedad común de todas estas células es su capacidad de realizar una división asimétrica.

La TU forma parte del aparato reproductor femenino y sufre cambios periódicos durante el ciclo menstrual que se traducen en daño y regeneración [30, 155]. La TU y el útero (endometrio) comparten el mismo origen embriológico a partir de la fusión de los conductos Müller, siendo tejidos muy dinámicos, ambos de origen mesodérmico [156]. Además, tanto el endometrio como las TU sufren cambios morfológicos y funcionales a lo largo del ciclo menstrual. El endometrio humano consiste en un epitelio que da origen a las glándulas y tejido conectivo (células del estroma) que se originan a partir del mesodermo. En este sentido, se ha señalado la existencia de células madre en el endometrio [157, 158]. Kato et al [159] aisló Side-population (SP) desde suspensiones de células endometriales y separadas en 2 fracciones de acuerdo al tamaño cuando pasaron a través de un filtro celular. La parte superior de la fracción celular (retenida en el filtro) contiene principalmente células epiteliales glandulares y escasas SP, mientras que la fracción celular inferior contenía células estromales y un mayor número de células SP. Las células SP de la fracción separada se diferencia tanto como células glandulares (fracción superior) o como células estromales (fracción inferior). Cabe hacer notar que las células estromales derivan de la diferenciación de células madre mesenquimáticas [118]. En este contexto, las células madre dentro de la capa basal del endometrio son capaces de generar células progenitoras que se diferencian en células epiteliales, estromales y endoteliales[118].

Wang et al [160] aisló células mesenquimáticas de TU humana y las diferenció de forma exitosa *in vitro* en adipocitos, osteoblastos y condrocitos. En esta misma línea, Jazedje et al [161] estudió en un modelo *in vivo* la capacidad de diferenciación osteogénica de células mesenquimáticas de la TU, pudiendo

regenerar de forma exitosa el hueso *in vivo* y abriendo nuevas alternativas para el tratamiento de la osteoporosis y reconstrucción de hueso.

En la presente Tesis Doctoral se ha realizado una descripción histoquímica e inmunohistoquímica de algunos componentes fibrilares y no fibrilares de la MEC de la TU humana durante el ciclo menstrual para determinar que estrategias de IT podrían ser utilizadas para la reparación o reemplazo de la TU humana.

# **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

- Establecer los patrones estructurales y arquitecturales, histoquímicos e inmunohistoquímicos, de los componentes de la matriz extracelular de la trompa uterina humana, en las distintas fases del ciclo menstrual para su utilización como modelos bioestructurales aplicables en protocolos de ingeniería tisular.

### **Objetivos específicos:**

- Identificar el depósito y la distribución del componente fibrilar de la matriz extracelular de la trompa uterina humana mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas con el objeto de establecer el patrón estructural y arquitectural del mismo a lo largo del ciclo menstrual.
- Identificar el depósito y la distribución del componente no fibrilar de la matriz extracelular de la trompa uterina humana mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas con el objeto de establecer el patrón estructural y arquitectural del mismo a lo largo del ciclo menstrual.
- Correlacionar los patrones estructurales y arquitecturales, histoquímicos, e inmunohistoquímicos, de los componentes fibrilar y no fibrilar de la matriz extracelular de la trompa uterina humana, en las distintas fases del ciclo menstrual, con modelos de matrices artificiales y soportes bioestructurales orgánicos para su posible aplicación a protocolos de ingeniería tisular.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Obtención de muestras y criterios de inclusión y exclusión**

Se colectaron 10 TU de mujeres sanas que se sometieron a esterilización quirúrgica por razones no relacionadas con este estudio, y con consentimiento informado firmado por cada participante. Los criterios de inclusión son: mujeres fértiles de 25 a 45 años de edad y solicitud voluntaria de esterilización quirúrgica. La técnica de esterilización quirúrgica utilizada por el servicio se llama Pomeroy, siendo la ampolla el segmento mejor preservado de la TU a través de este procedimiento. Los criterios de exclusión de este estudio se resumen en la tabla 1. Una muestra de sangre ha sido obtenida durante cada procedimiento de tal manera que la etapa del ciclo puede ser determinada usando los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona junto con la historia menstrual. En este sentido, se colectaron 7 TU de la fase folicular y 3 de la fase lútea. Este proyecto fue aprobado por los comités de ética del “Servicio de Salud Metropolitano Norte” y la “Universidad de Santiago de Chile” (Anexo 1, página 134).

### **Criterios de Exclusión**

- **Antecedentes de infecciones de transmisión sexual**
- **Enfermedad tubaria**
- **Enfermedad pélvica inflamatoria**
- **Endometriosis**
- **Haber utilizado métodos anticonceptivos hormonales dentro de los 3 meses antes de la cirugía**
- **Consumo excesivo de alcohol, tabaco o abuso de drogas**

Tabla 1: Criterios clínicos de exclusión.

<b>Paciente</b>	<b>Estradiol</b>	<b>Progesterona</b>	<b>LH</b>	<b>FSH</b>	<b>Fase ciclo menstrual</b>
	<b>pg/ml</b>	<b>ng/ml</b>	<b>mUI/ml</b>	<b>mUI/ml</b>	
<b>3</b>	58	1,6	2,8	4,5	folicular
<b>4</b>	49	1,7	1,9	5,9	folicular
<b>5</b>	115	1,1	7,3	3,6	folicular
<b>6</b>	16	1,6	4,9	5,4	folicular
<b>7</b>	140	18,1	0,75	1,7	lútea
<b>8</b>	39	1,5	7,7	4,6	folicular
<b>9</b>	207	9,5	3,4	2,6	lútea
<b>10</b>	57	1,6	2,7	11,3	folicular
<b>11</b>	70	0,9	4,3	2,9	folicular
<b>12</b>	160	7,7	3,7	2,9	lútea

Tabla 2: Análisis de hormonal de plasma sanguíneo de participantes del estudio. N=10

## **3.2 Análisis histológico**

### **3.2.1 Procesamiento de muestras**

Primeramente, las muestras fueron fijadas en formalina neutra al 10% (formaldehído 4%) por 24 horas. Posteriormente, fueron deshidratadas en soluciones crecientes de alcohol (70° 96° y 99°), seguido de soluciones de xilol (tabla 3). A continuación, fueron incluidas en parafina y cortadas con micrótopo a 5 micras de espesor. Las secciones histológicas fueron depositadas sobre portaobjetos silanizados para favorecer una adecuada adhesión de los tejidos. Las muestras fueron secadas a 55° C por 60 minutos y almacenadas. A partir de las muestras antes mencionadas se realizaron las técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas como se detalla en los siguientes apartados.

<b>REACTIVO</b>	<b>TIEMPO (TEJIDO)</b>
<b>Alcohol 70 %</b>	1 hora
<b>Alcohol 96 % I</b>	1 hora
<b>Alcohol 96 % II</b>	30 min.
<b>Alcohol 99 % I</b>	30 min.
<b>Alcohol 99% II</b>	30 min.
<b>Alcohol 99% III</b>	1 hora
<b>Xilol I</b>	45 min.
<b>Xilol II</b>	30 min.
<b>Xilol III</b>	30 min.
<b>Parafina I</b>	1 hora
<b>Parafina II</b>	1 hora
<b>Incluir muestras</b>	6 horas

Tabla 3: Protocolo de deshidratación, aclaramiento e impregnación en parafina de muestras biológicas para estudio histológico [47, 162].

Para la evaluación histológica general de las muestras, se realizó el método de tinción Hematoxilina Eosina (H-E). Las muestras fueron desparafinadas, hidratadas y sumergidas en hematoxilina de Mayer por 5 minutos. Se aclaró la tinción en agua corriente por 5 minutos, seguido de agua destilada. Posteriormente, las secciones se contrastaron con Eosina durante 3 minutos.

Finalmente, se procedió a la deshidratación, aclaramiento y montaje de la muestra con medio de montaje hidrófobo y cubiertas con cubreobjeto [47, 162].

### **3.2.2 Análisis histoquímico de la matriz extracelular**

El análisis histoquímico de los componentes fibrilares y no fibrilares de la MEC de la TU se dividió en distintas etapas: 1) Los tejidos fijados en formalina neutra al 10% fueron incluidos en parafina y posteriormente cortados (5 micras); 2) las muestras fueron desparafinadas en xilol e hidratadas (tabla 4); 3) El primer grupo de muestras fueron teñidas con técnica de picrosirius, tricrómico de Masson y orceína para evaluar los componentes fibrilares de la matriz; 4) El segundo grupo de muestras fueron teñidas con azul alcian para identificar los componentes no fibrilares (proteoglicanos ácidos); 5) El tercer grupo de muestras fueron teñidas con ácido peryódico de Schiff para identificar glicoproteínas. Finalmente, todas las muestras fueron deshidratadas, aclaradas y montadas.

SOLUCION	TIEMPO
Xilol	10 min.
Xilol	10 min.
Xilol	10 min.
Alcohol 100 <sup>o</sup>	5 min.
Alcohol 100 <sup>o</sup>	5 min.
Alcohol 96 <sup>o</sup>	5 min.
Alcohol 96 <sup>o</sup>	5 min.
Alcohol 70 <sup>o</sup>	5 min.
Alcohol 70 <sup>o</sup>	5 min.
Agua destilada	5 min.

Tabla 4: Protocolo de rutina de desparafinación e hidratación de muestras. Nota, la misma batería, en sentido inverso, se utiliza para la deshidratación de cortes después de la coloración.

### Caracterización de los elementos fibrilares

- **Método histoquímico de picrosirius**

La tinción de Picrosirius es una técnica ampliamente utilizada para identificar fibras colágenas, uno los principales componentes de la MEC. En

este sentido, las secciones histológicas se tiñeron con un método modificado de picrosirius [163-165] durante 30 minutos en una solución de Sirius Red (Sigma-Aldrich, Product number: 365548, USA), contrastándose después con hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a deshidratación a través de la aplicación de alcoholes con una concentración ascendente. Finalmente, las muestras fueron aclaradas (xileno), y montadas con cubreobjetos utilizando un medio montaje hidrófobo.

- **Tricrómico de Masson**

La tinción tricrómico de Masson es una técnica histoquímica utilizada para la detección de fibras colágenas. En primer lugar, las muestras histológicas se sumergieron en solución de Bouin durante toda la noche. Posteriormente, fueron incubadas con solución de hematoxilina de Weigert durante 10 minutos, seguido de solución de fuchina ácida escarlata por 3 minutos. A continuación, se incubaron con solución de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico por 5 minutos, seguido de solución verde luz por 5 minutos. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas, aclaradas y montadas con cubreobjeto [47, 48].

- **Método de orceína**

Para la detección de fibras elásticas se utilizó la técnica de orceína. Una vez las muestras desparafinadas e hidratadas, se sumergieron en solución de orceína durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron en agua corriente por 15 minutos y se contrastaron con Hematoxilina de Mayer por 30 segundos. Finalmente, se procedió a la deshidratación, aclaramiento y montaje [47, 48].

### **Caracterización de la sustancia fundamental de la matriz extracelular**

- **Método histoquímico de ácido peryódico de Schiff (PAS)**

Este método histoquímico permite la identificación de mucosustancias neutras y glicoproteínas. Las secciones tisulares fueron sumergidas en una solución de ácido peryódico al 0,5% durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en reactivo de Schiff durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas, aclaradas y montadas con cubreobjeto [47, 48].

- **Método de azul alcian**

La presencia de proteoglicanos ácidos fue determinada por la técnica histoquímica de azul de alcian (Panreac, Darmstadt, Germany). Las muestras fueron incubadas en solución de azul alcian pH 2,5 por 30 minutos. Posteriormente, las secciones fueron contrastadas con *nuclear fast red*. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas, aclaradas y montadas [47, 48].

- **Análisis inmunohistoquímico de la Matriz Extracelular**

La detección de componentes específicos de la MEC en las muestras estudiadas se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos (tabla 5) y siguiendo protocolos desarrollados por nuestro grupo [49, 127, 128, 162, 164, 166]. Primeramente, se obtuvieron cortes de 5 micras, los cuales se desparafinaron en xileno e hidrataron como se describió apartados anteriores. Debido a que muchos epítopes quedan enmascarados durante el proceso de fijación por formalina se realizó el proceso de recuperación antigénica. Esta recuperación puede ser por digestión enzimática o calor. La selección de tipo de recuperación dependió del tipo de molécula a estudiar. Posteriormente, se inactivó la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) (Panreac, Darmstadt, Germany) en PBS o metanol. Cada uno de los pasos siguientes fue seguido por un lavado con solución buffer fosfato pH 7 (PBS). El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó utilizando solución de CAS-Block 1x (Vector, Burlingame, CA, USA). A continuación, se efectuó la incubación del anticuerpo primario, la

información técnica de cada anticuerpo se encuentra resumida en la tabla 6. Después de lavados en PBS, todas las secciones fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente en anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (tabla 6), la selección del tipo de anticuerpo secundario dependió del tipo de anticuerpo primario utilizado. La reacción antígeno-anticuerpo fue detectada 3,30-diaminobenzidina (DAB) peroxidase substrate kit SK-4100 (Vector). El tiempo del revelado para cada inmunohistoquímica, dependió de la estandarización previa para cada marcador. Luego del revelado, se procedió a lavar con agua destilada y realizar el contraste con hematoxilina de Harris por 15 segundos. Posteriormente, se realizó la deshidratación, aclaramiento y montaje de las muestras. Además, en cada técnica de inmunohistoquímica se llevó un control negativo, omitiendo la incubación del anticuerpo primario. También, fueron utilizados controles positivos externos de colágenos (piel humana) y proteoglicanos (placenta humana).

ANTICUERPOS	DILUCIÓN/ INCUBACIÓN	PRE-TRATAMIENTO	REFERENCIA
<b>Policlonal de conejo anti-colageno I</b>	1:200 Toda la noche 4 °C	Buffer EDTA pH 8, 25 minutos a 95 °C	Acris antibodies, Germany, Product number: R1038.
<b>Policlonal de conejo anti-colageno III</b>	1:250 60 minutos	Buffer citrato pH 6, 25 minutos a 95 °C	ABCAM Cambridge UK. Product number: ab7778.
<b>Policlonal de conejo anti-biglican</b>	1:100 60 minutos	Buffer citrato pH 6, 25 minutos a 95 °C	ABCAM Cambridge UK. Product number: ab49701.
<b>Policlonal de conejo anti-fibromodulin (LF-150)</b>	1:500 Toda la noche 4 °C	Condroitinasa ABC 60 minutos 37 °C	Dr. Larry Fisher (National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH Bethesda)
<b>Policlonal de conejo anti-versican</b>	1:100 Toda la noche 4 °C	Condroitinasa ABC 60 minutos 37 °C	ABCAM Cambridge UK. Product number: ab19345
<b>Policlonal de cabra anti-decorin</b>	1:500 Toda la noche 4 °C	Condroitinasa ABC 60 min 37 °C	R&System Product number: AF143
<b>Horse anti-goat IgG (peroxidase)</b>	RTU	-	Vector Laboratories, CA, USA; cat. no. PI 9500
<b>Horse anti-rabbit IgG (peroxidasa)</b>	RTU	-	Vector Laboratories, CA, USA; cat. no. MP-7401

Tabla 5: Anticuerpos utilizados en esta tesis Doctoral. Para cada anticuerpo se muestra la dilución, pre-tratamiento y referencia utilizada.

PROCEDIMIENTO	TIEMPO	SOLUCION/DILUCION
<b>Desparafinar e hidratar</b>	10 min. c/u xilol x 3 5 min. c/u (ETOH 70 <sup>o</sup> , 96 <sup>o</sup> 100 <sup>o</sup> , y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Batería de desparafinación
<b>Recuperación antigénica</b>	25 min. a 95 C <sup>o</sup> enfriar por 20 minutos (a temperatura ambiente) o digestión enzimática.	Buffer citrato pH 6.0 o Buffer EDTA pH 8 o Pepsina o condroitinasa
<b>Lavado en agua destilada</b>	5 min. a temperatura ambiente	Agua destilada
<b>3 lavados en PBS tween 20</b>	5 min. c/u a temperatura ambiente	PBS 0,1 m 0,3% tween 20
<b>Bloqueo de peroxidasa</b>	10 min. a temperatura ambiente	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%) en PBS
<b>3 lavados en PBS tween 20</b>	5 min. c/u a temperatura ambiente	PBS 0,1 m 0,3% tween 20
<b>Bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos</b>	15 min.	Caseína
<b>Incubación anticuerpo primario</b>	El tiempo de incubación depende del anticuerpo usado	La dilución esta estandarizada y depende del anticuerpo utilizado
<b>3 lavados en PBS tween 20</b>	5 min c/u a temperatura ambiente	PBS 0,1 m 0,3% tween 20
<b>Incubación anticuerpo secundario</b>	Polímero impress reagent (vector) 30 min.	Depende del anticuerpo utilizado
<b>3 lavados en PBS tween 20</b>	5 min. c/u a temperatura ambiente	PBS 0,1 m 0,3% tween 20
<b>Revelación</b>	2-5 min.	DAB
<b>Lavado en agua destilada</b>	5 min. a temperatura ambiente	Agua destilada
<b>Contraste</b>	15 segundos	Hematoxilina de Harris
<b>deshidratar, aclarar y montar</b>	10 segundos c/u	Batería de deshidratación

Tabla 6: Protocolo general utilizado para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica.

# **RESULTADOS**

## **4.- RESULTADOS**

### **4.1 Evaluación de la estructura general de la TU**

El análisis mediante la técnica histoquímica de H-E reveló que la mucosa esta revestida internamente por un epitelio columnar simple con células ciliadas, con una lámina propia de tejido conectivo subyacente (Fig. 18 y 19). Además, la mucosa presenta abundantes pliegues con distinto número de ramificaciones. La capa muscular está compuesta por haces de células musculares lisas, algunos con un ordenamiento circular y otros con una orientación longitudinal. En la serosa destaca la presencia de un epitelio escamoso simple y tejido conectivo. En la capa antes mencionada se observaron abundantes vasos sanguíneos y fascículos nerviosos periféricos.

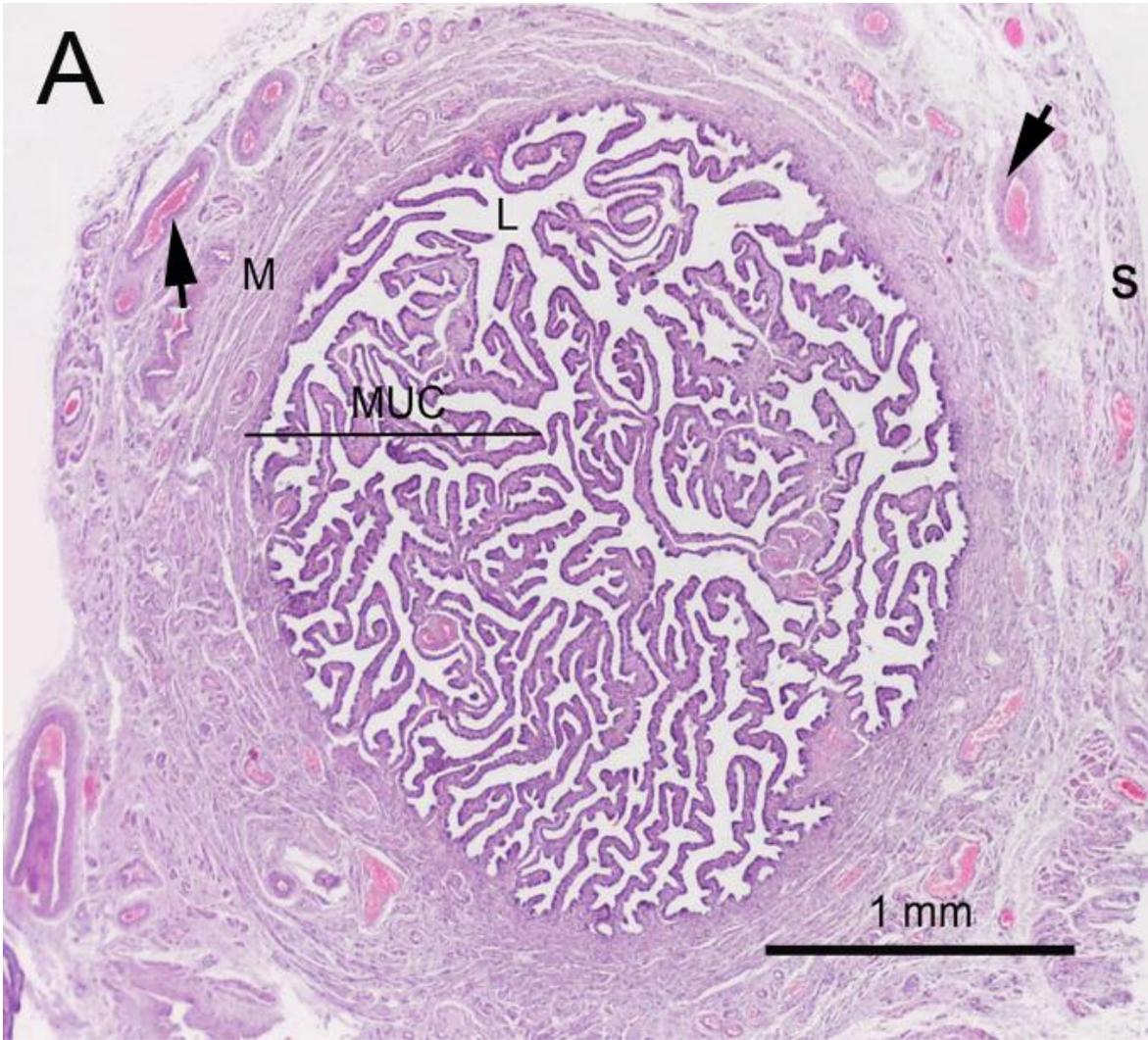


Fig.18 Técnica histoquímica de hematoxilina eosina. La imagen corresponde a un corte transversal de la ampolla, nótese las tres capas: mucosa (muc), muscular (m) y serosa (s). A nivel de la serosa se observaron abundantes vasos sanguíneos (flechas).

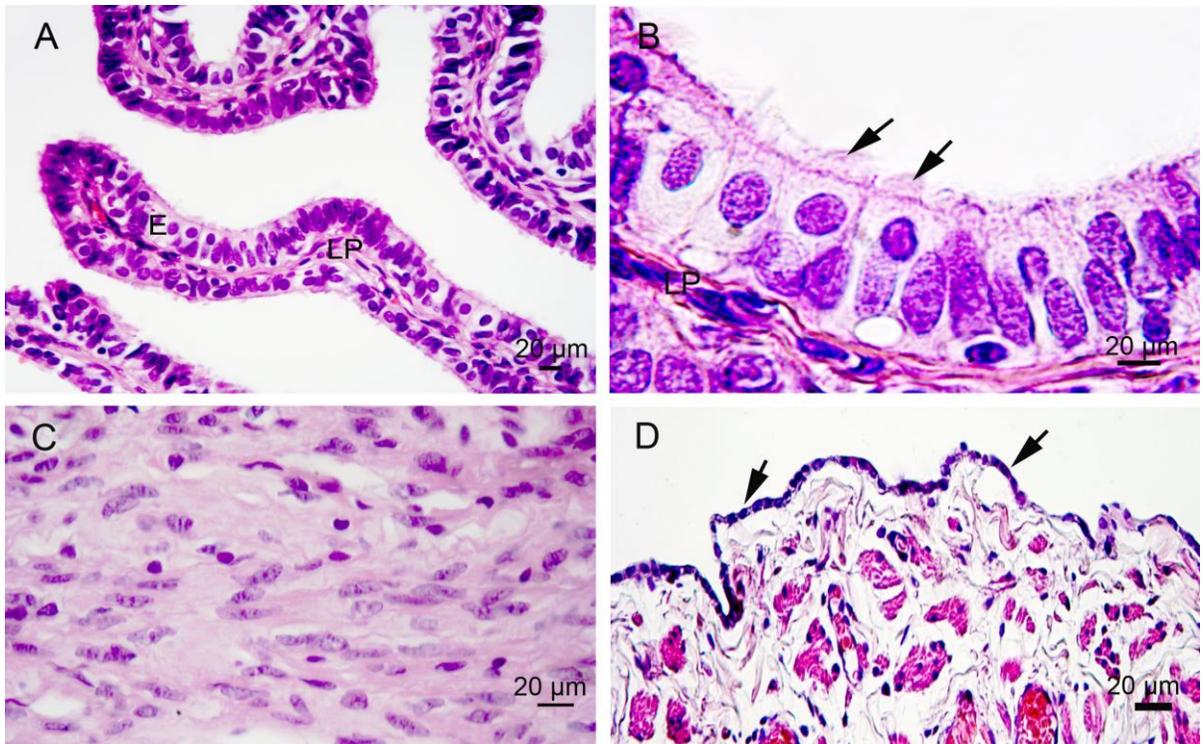


Fig. 19 Técnica histoquímica de hematoxilina eosina. (A) En la mucosa se observaron abundantes pliegues, los cuales se encuentran tapizados por un epitelio columnar simple (E). En la imagen B nótese a mayor aumento el epitelio cilíndrico compuesto por células ciliadas (flechas) entre otros tipos celulares, este tejido se apoya sobre una lámina propia (LP) de tejido conectivo laxo. En la imagen C se observó la capa muscular, específicamente su capa circular interna constituida por células musculares lisas. La imagen D corresponde a la serosa la cual está tapizada por un epitelio escamoso simple (flechas), y subyacente a este se observa tejido conectivo.

## **4.2 Caracterización histoquímica de los componentes de la matriz extracelular de la trompa uterina durante la fase folicular y lútea.**

### **4.2.1 Caracterización de los componentes fibrilares.**

- **Picrosirius**

El análisis de la distribución de colágenos mediante la técnica de Picrosirius reveló una tinción roja en el intersticio de la mucosa, muscular y serosa (Fig. 20). A nivel de la lámina propia de los pliegues de la mucosa, las fibras colágenas se organizaron de forma paralela. En la capa muscular se observó una reacción positiva entre los haces de células musculares lisas. En la serosa, se identificó una reacción positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Además, fue observada una reacción positiva en los fascículos nerviosos periféricos y adventicia de vasos sanguíneos.

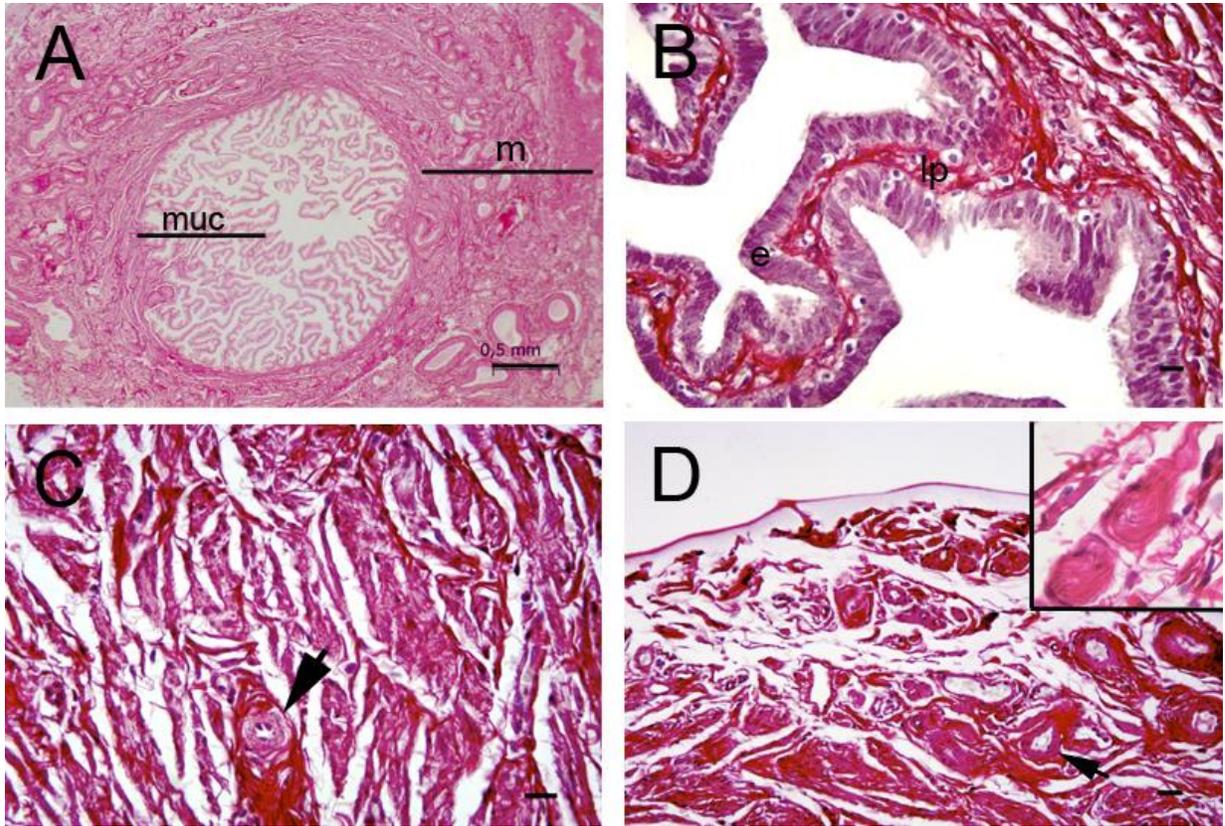


Fig. 20 Técnica histoquímica de Picrosirius. (A) Se observó una amplia distribución de colágeno en el intersticio de la mucosa (muc) y capa muscular (m). La imagen B corresponde a un aumento de la mucosa donde se observó una organización paralela de las fibras de colágeno de la lámina propia (lp). (C) Nótese la distribución de colágeno en el tejido conectivo que rodea a las células musculares lisas y vasos sanguíneos (flecha). (D) En la serosa se advirtió una reacción positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio y alrededor de los vasos sanguíneos (flecha). E: epitelio. Barra calibradora 20  $\mu$ m.

- **Tricrómico de masson**

El análisis mediante la técnica histoquímica de tricrómico de masson reveló una mucosa revestida por un epitelio columnar simple con células ciliadas (Fig. 21). En esta capa además se observó una lámina propia de tejido conectivo laxo compuesta principalmente de fibras de colágeno. En la capa muscular se advierten haces de células musculares lisas con una orientación circular y longitudinal. Entre en las células musculares lisas se observó tejido conectivo denso irregular compuesto por fibras colágenas. La serosa esta tapizada por un epitelio escamoso simple con tejido conectivo subyacente (colágeno). En esta capa, destaca la presencia de grandes vasos sanguíneos, fibras nerviosas periféricas y células musculares lisas aisladas.

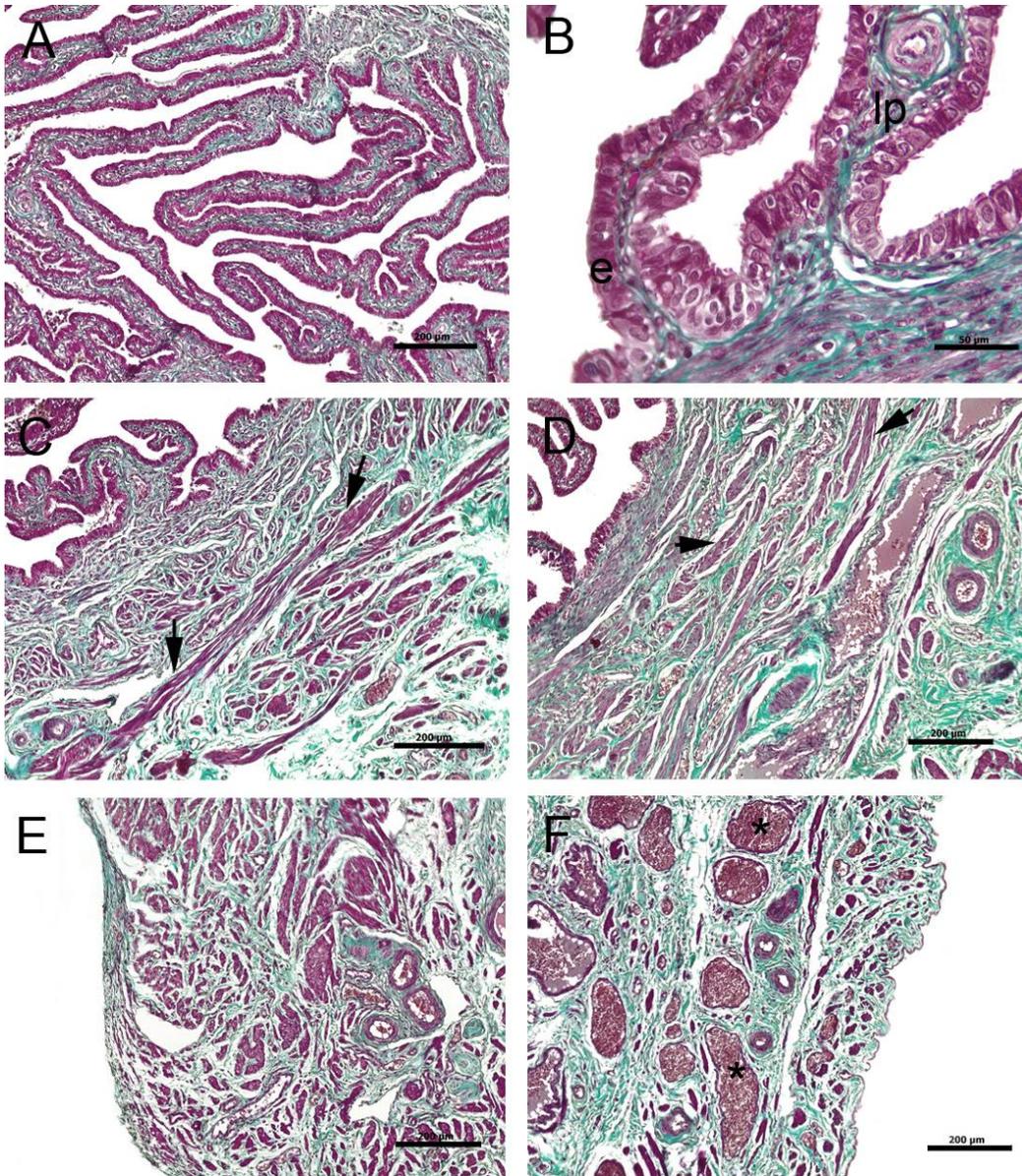


Fig. 21 Técnica histoquímica de tricrómico de Masson. En esta imagen se observó la morfología y distribución de colágeno en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). La imagen A y B muestran el epitelio columnar simple (e) de la mucosa y la presencia de colágeno (verde) en la lámina propia (lp). En C y D se observó una distribución de colágeno rodeando a las células musculares lisas (flechas). (E, F) En la serosa existe una distribución de colágeno en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. (\*): vasos sanguíneos.

## **Orceína**

En la mucosa y capa muscular se observó una marcación débil para fibras elásticas en el tejido conectivo (Fig. 22). No obstante, en la serosa y capa muscular, se advirtió la presencia de fibras elásticas en la lámina elástica interna de grandes vasos sanguíneos.

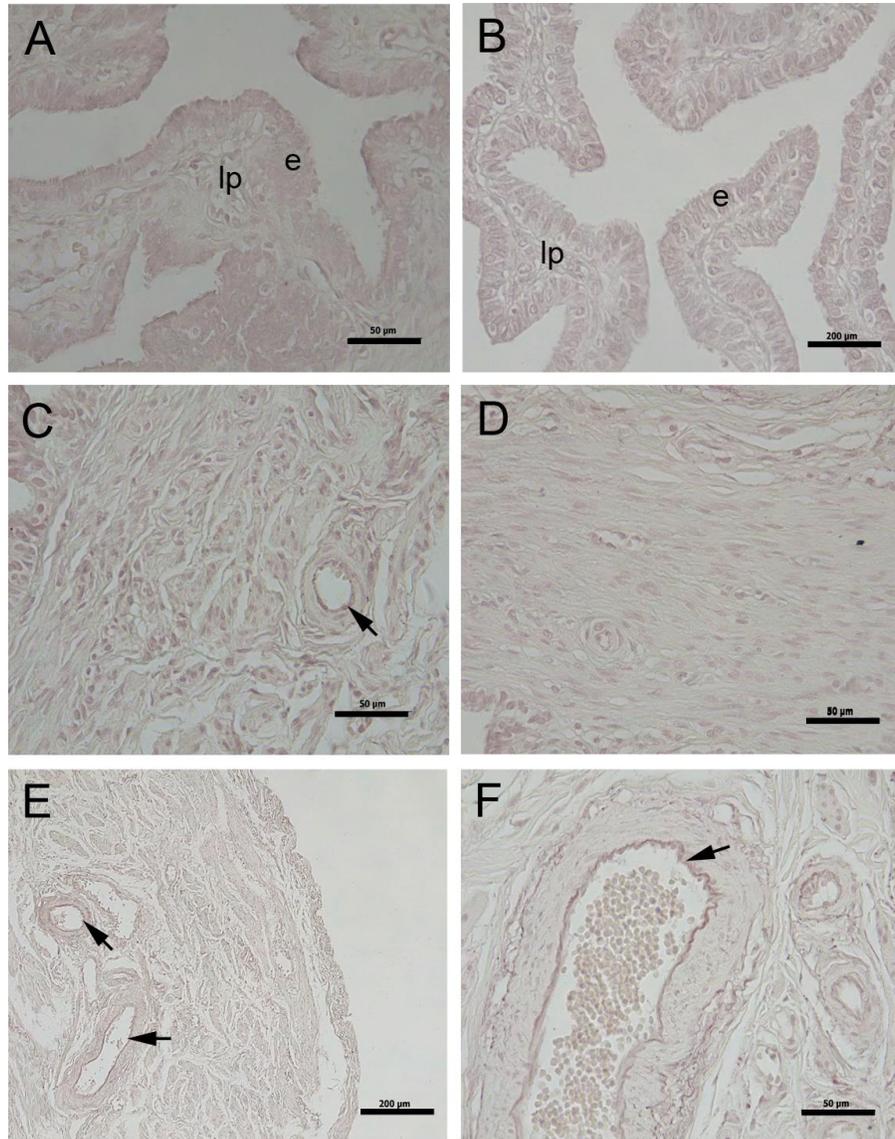


Fig. 22 Técnica histoquímica de orceína. En esta imagen se observa la distribución de fibras elásticas en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). En la mucosa (A, B) y capa muscular (C, D) se observó una débil marcación para fibras elásticas en el tejido conectivo. (E, F) En la serosa, se advirtió la presencia de fibras elásticas (flechas) en la lámina elastica interna de grandes vasos sanguíneos. Flecha: lámina elastica interna.

#### **4.2.2 Caracterización de los componentes no fibrilares.**

##### **Azul de alcian**

La superficie apical del epitelio de la mucosa fue positiva para azul de alcian confirmando a este nivel la presencia de mucopolisacáridos ácidos (Fig. 23). La lámina propia muestra una reacción histoquímica débil para azul de alcian, mientras que el tejido conectivo que rodea a las células musculares lisas presentó una reacción positiva para este proteoglicano. En el tejido conectivo de la serosa, se observó una reacción positiva para azul de alcian confirmando la presencia de proteoglicanos. Además, fueron observados proteoglicanos ácidos en la adventicia y túnica muscular de grandes vasos sanguíneos, así como en el endoneuro de fascículos nerviosos periféricos.

##### **PAS**

La superficie apical del epitelio de la mucosa fue positiva para la técnica histoquímica de PAS confirmando a este nivel la presencia de mucosustancias (Fig. 23). Además, se observó una reacción positiva en la membrana basal subyacente al epitelio. En la capa muscular y serosa se advirtió una marcación positiva en las células musculares lisas y alrededor de vasos sanguíneos.

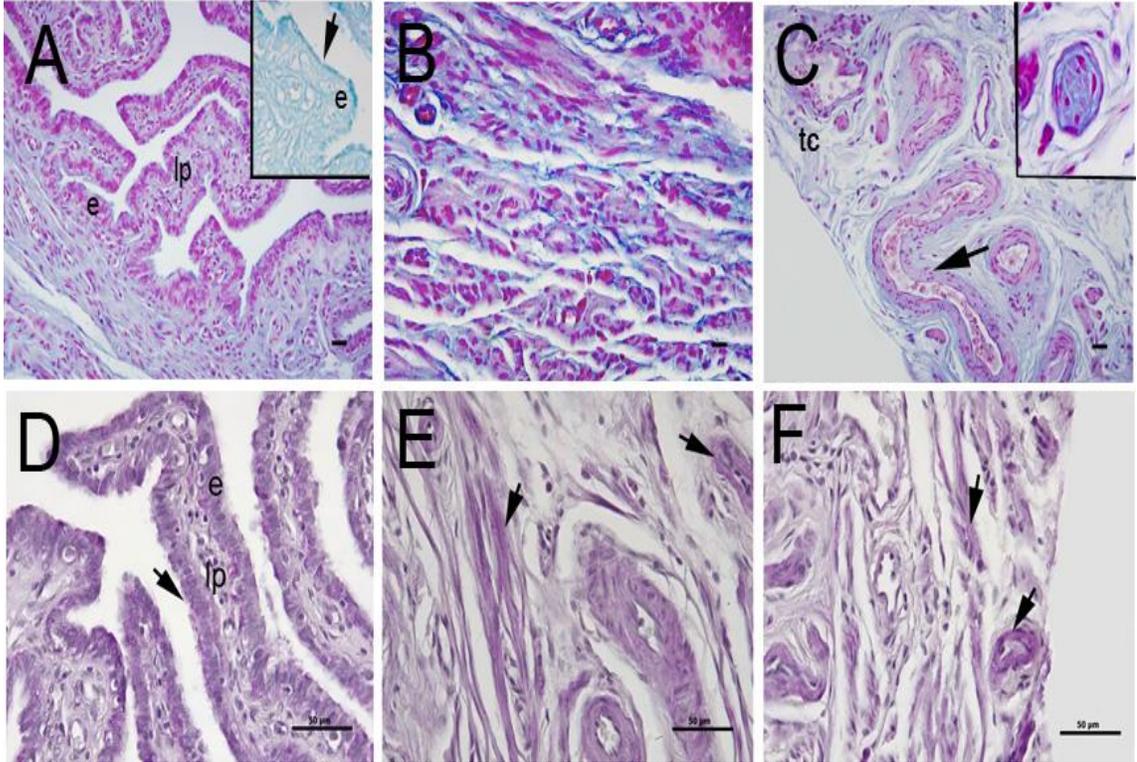


Fig. 23 Técnicas histoquímicas de azul de Alcian (A-C) y PAS (D-F). (A) Existe una reacción positiva en la superficie epitelial apical (flecha), así como también en la lámina propia (lp). (B) En la capa muscular la reacción estuvo circunscrita principalmente a nivel del tejido conectivo. (C) En la serosa se observó la presencia de proteoglicanos ácidos en el tejido conectivo subyacente al mesotelio y vasos sanguíneos (flecha). Nótese la reacción positiva en fascículos nerviosos periféricos (inserto). Barra calibradora 20  $\mu\text{m}$ . (D) La superficie apical del epitelio de la mucosa fue positivo para la técnica histoquímica de PAS (flechas). En la capa muscular (E) y serosa (F) se advirtió una marcación positiva en las células musculares lisas (flechas) y alrededor de vasos sanguíneos. Barra calibradora 50  $\mu\text{m}$ .

### **4.3 Caracterización inmunohistoquímica de los componentes de la matriz extracelular de la trompa uterina durante la fase folicular y lútea.**

#### **4.3.1 Distribución tisular de fibras colágenas.**

##### **Colágeno I**

El análisis de la expresión y distribución de colágeno I por inmunohistoquímica reveló una amplia expresión y distribución en el intersticio de la ampolla en ambos periodos del ciclo menstrual (fase folicular y lútea) (Fig. 24). En la mucosa existe una inmunomarcación positiva para colágeno I en la lámina propia. En la capa muscular la inmunoreacción está distribuida principalmente en el tejido conectivo que rodea a las células musculares lisas y alrededor de los vasos sanguíneos. En la serosa se observó una inmunomarcación positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Además, en dicha capa detectamos una expresión positiva de colágeno I en el perineuro y endoneuro de fascículos nerviosos periféricos y alrededor de vasos sanguíneos.

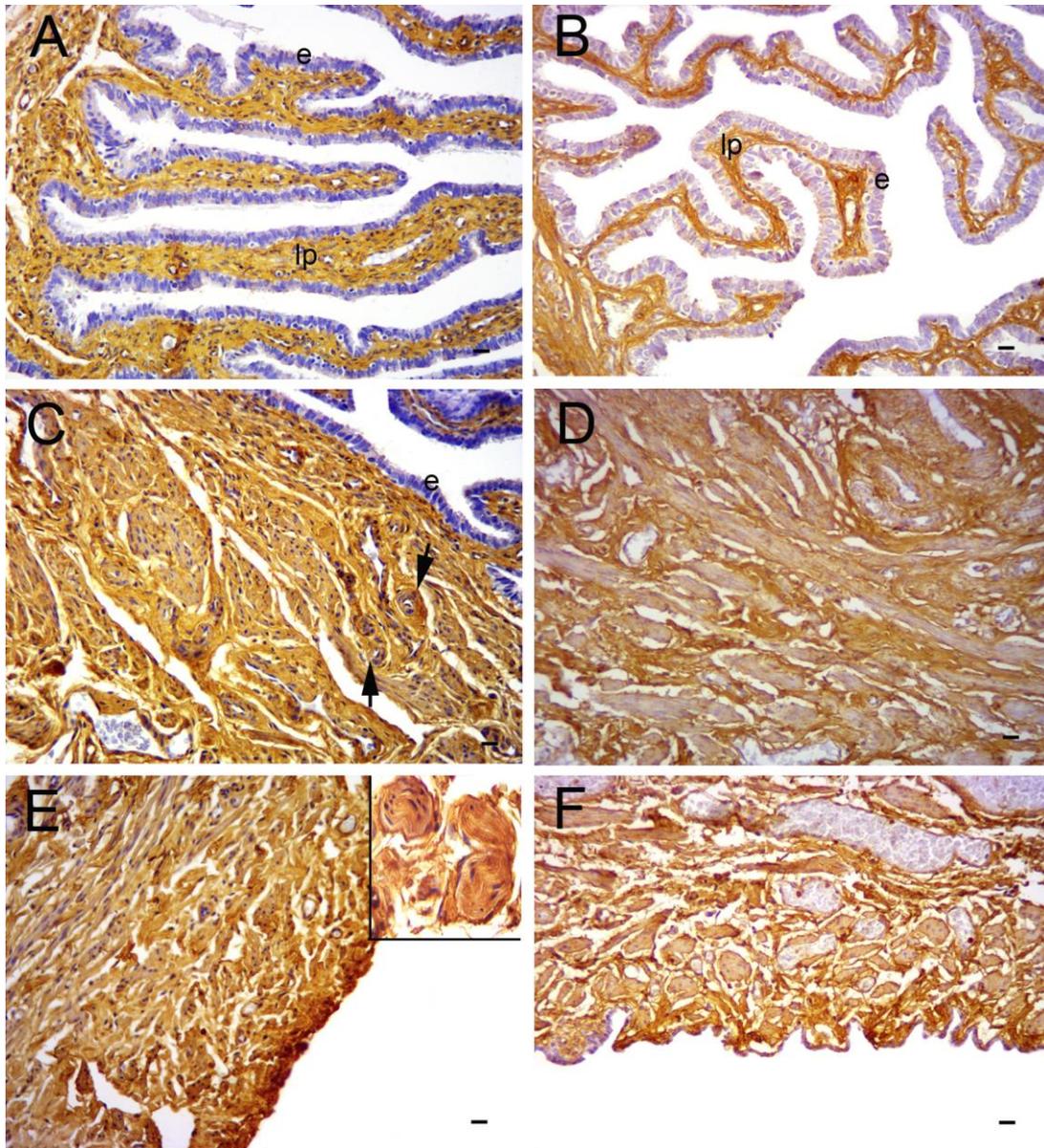


Fig. 24 Inmunohistoquímica de proteína colágeno I. En esta imagen se observó la expresión de colágeno I en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). La imagen A y B muestran una inmunomarcación a nivel de la lámina propia. (C, D) Se observó una inmunoreacción en el tejido conectivo que rodea las células musculares lisas y alrededor de los vasos sanguíneos (flechas). (E, F) La serosa presenta una distribución de colágeno I en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. El inserto muestra una inmunomarcación positiva para colágeno en nervios. E: epitelio; lp: lámina propia. Barra calibradora 20  $\mu$ m.

## **Colágeno III**

Al identificar las fibras de colágeno III mediante técnica inmunohistoquímica se observó una amplia distribución en el intersticio de la ampolla en ambos periodos del ciclo menstrual (fase folicular y fase lútea) (Fig. 25). Se advirtió una expresión positiva para colágeno III en la lámina propia de la mucosa. Cabe hacer notar que en el tejido conectivo que rodea las células musculares lisas de la capa muscular existe una inmunoreacción positiva. En cambio, en la serosa se observó una inmunomarcación positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Además, identificamos una expresión positiva de colágeno III en el perineuro y endoneuro de fascículos nerviosos periféricos y adventicia de vasos sanguíneos.

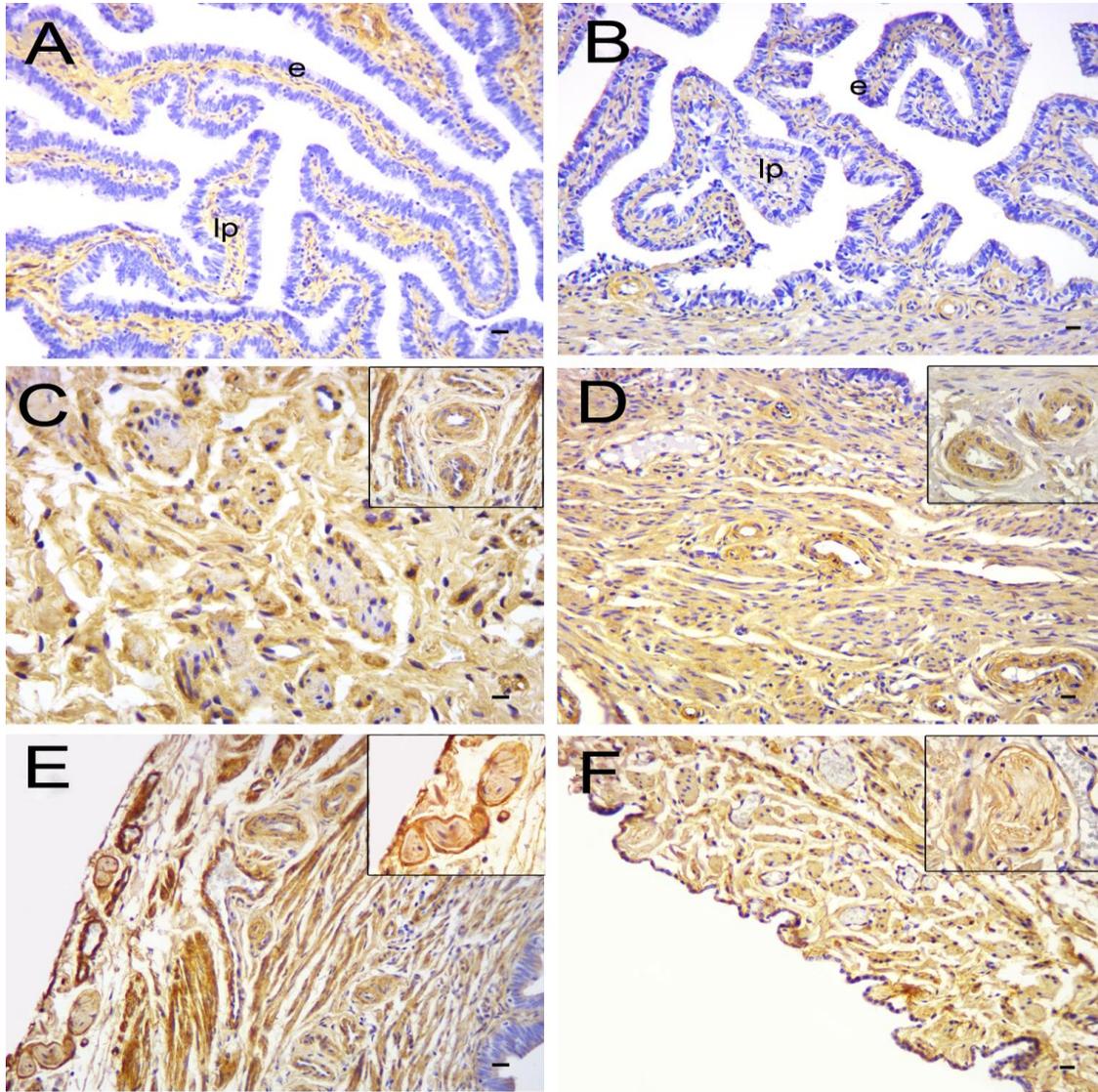


Fig. 25 Inmunohistoquímica de proteína colágeno III. En esta imagen se observó la expresión de colágeno III en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). (A, B) Se advirtió una inmunomarcación positiva en la lámina propia de los pliegues de la mucosa. (C, D) En la capa muscular se observó una reacción positiva en el tejido conectivo que rodea a las células musculares lisas. Nótese en los insertos la distribución de colágeno III alrededor de los vasos sanguíneos. (E, F) La serosa presenta una inmunomarcación positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Además, se muestra una inmunomarcación positiva de colágeno III en fascículos nerviosos periféricos. E: epitelio; lp: lámina propia. Barra calibradora 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.3.2 Caracterización de los proteoglicanos de la matriz extracelular de la trompa uterina durante la fase folicular y lútea.**

##### **Biglican**

El análisis inmunohistoquímico de biglican reveló una distribución específica de este proteoglicano en la TU (Fig. 26). Biglican estuvo asociado principalmente a la adventicia y túnica muscular de vasos sanguíneos de diferentes calibres. En este sentido, tanto en la capa muscular como serosa, existe una expresión positiva de biglican alrededor de vasos sanguíneos y en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Es interesante señalar que biglican no se encuentra asociado a fascículos nerviosos periféricos en ningunas de las capas de la TU.

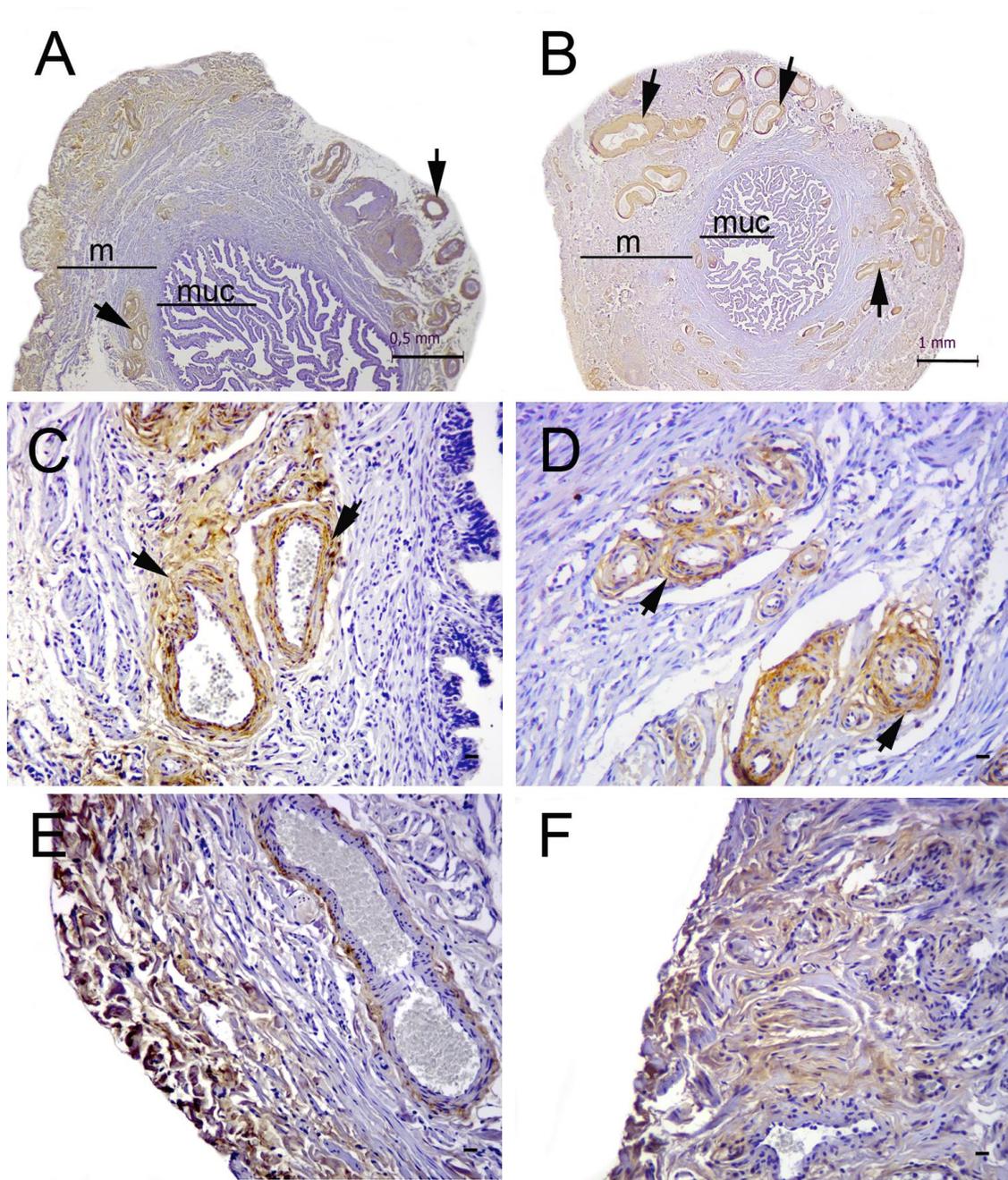


Fig. 26 Inmunohistoquímica de proteoglicano biglican. En esta imagen se observó la expresión de biglican en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). La inmunomarcación estuvo circunscrita a vasos sanguíneos (flechas) de distintos calibres en la capa muscular (C, D) y serosa (E, F). Nótese la expresión positiva de biglican en el tejido conectivo subyacente al mesotelio (E, F). M: capa muscular; muc: capa mucosa. Barra calibradora 20  $\mu$ m.

## **Decorin**

El análisis inmunohistoquímico de decorin mostró una amplia distribución de este proteoglicano en la ampolla de la TU (Fig. 27). En la mucosa se observó una inmunomarcación positiva en la lámina propia de los pliegues de la mucosa. En la capa muscular la reacción estuvo distribuida principalmente en el tejido conectivo que rodea las células musculares lisas. En cambio, en la serosa, existe una inmunoreacción positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Además, decorin se expresó en la adventicia de vasos sanguíneos y endoneuro de fascículos nerviosos periféricos.

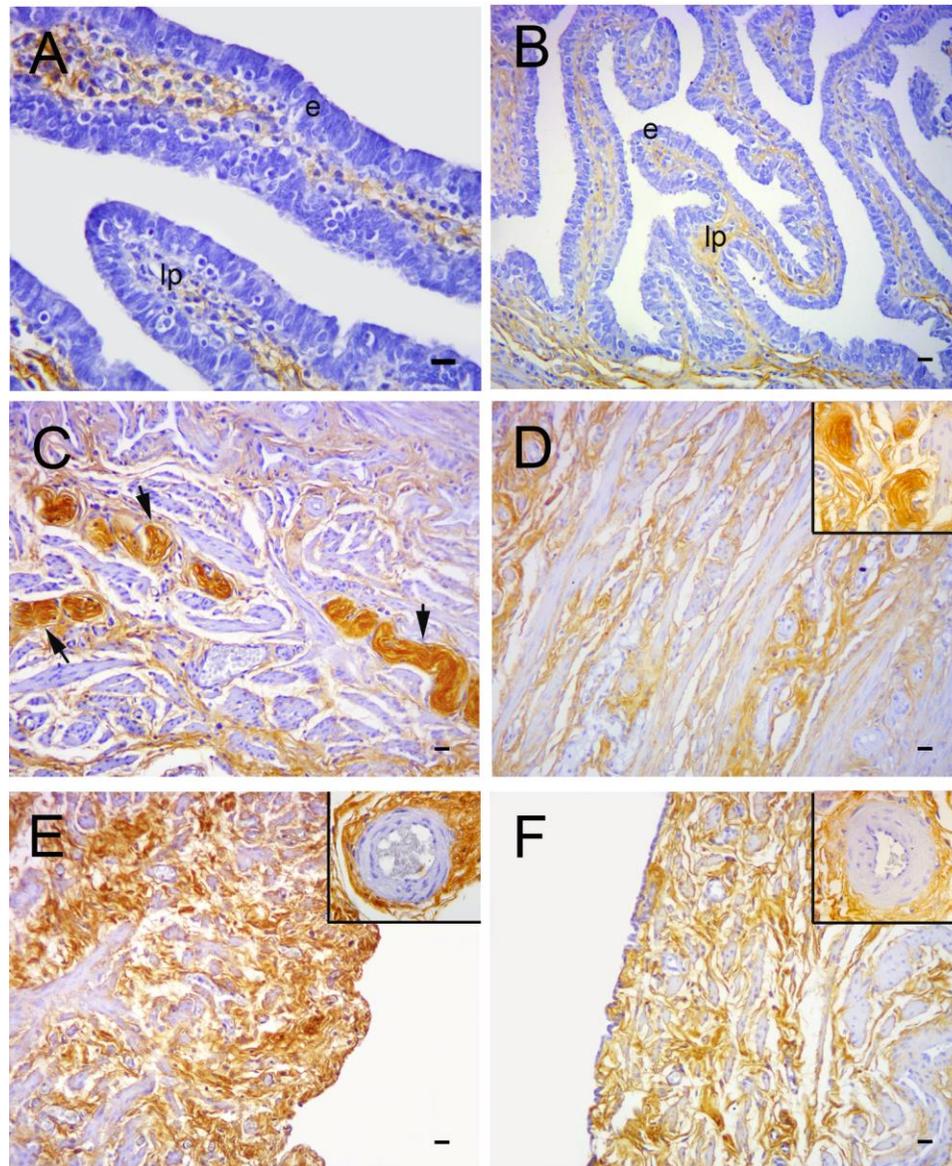


Fig. 27 Inmunohistoquímica de proteoglicano decorin. En esta imagen se observó la expresión de decorin en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). La inmunomarcación estuvo circunscrita a la lámina propia de los pliegues de la mucosa (A, B). En la capa muscular la reacción estuvo circunscrita al tejido conectivo que rodea las células musculares lisas (C, D). Se advirtió una inmunomarcación positiva en los fascículos nerviosos periféricos (flechas, inserto). (E, F) Nótese la expresión positiva de decorin en el tejido conectivo subyacente al mesotelio y vasos sanguíneos (insertos). E: epitelio; lp: lámina propia. Barra calibradora 20  $\mu$ m.

## **Fibromodulin**

El análisis reveló una inmunoreacción positiva para fibromodulin en la superficie epitelial apical de la mucosa (Fig. 28). Además, este proteoglicano se expresó intensamente a nivel de la lámina propia. En la capa muscular y serosa, la reacción estuvo principalmente distribuida en el tejido conectivo y células musculares lisas. El análisis de los vasos sanguíneos y fascículos nerviosos periféricos reveló una fuerte reacción positiva en adventicia y endoneuro, respectivamente.

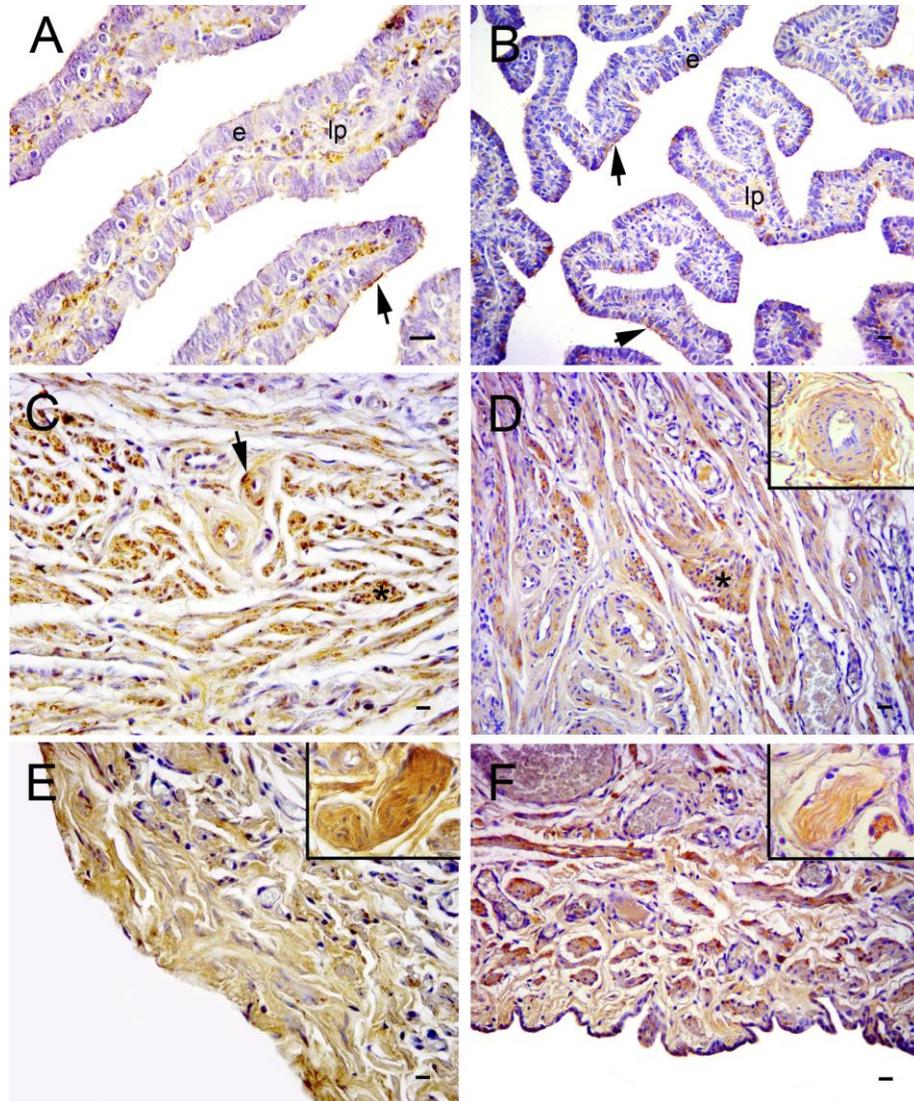


Fig. 28 Inmunohistoquímica de proteoglicano fibromodulin. En esta imagen se observó la expresión de fibromodulin en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). (A, B) Existe una inmunomarcación positiva en la superficie epitelial apical (flechas) y lámina propia. (C, D) En la capa muscular la reacción estuvo circunscrita principalmente a nivel del tejido conectivo y musculo liso (asteriscos). La flecha y el inserto corresponden a una reacción positiva de fibromodulin para vasos sanguíneos. (E, F) Nótese en la serosa la inmunoreacción positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Los insertos corresponden a una inmunomarcación positiva en fascículos nerviosos periféricos. E: epitelio; lp: lámina propia. Barra calibradora 20  $\mu$ m.

## **Versican**

El análisis inmunohistoquímico de versican muestra una reacción positiva en la superficie epitelial apical de la mucosa (Fig. 29). Esta reacción es comparable a lo observado con azul de alcian y fibromodulin, confirmando la presencia de proteoglicanos a este nivel. En la capa muscular, la inmunoreacción estuvo principalmente distribuida en el tejido conectivo que rodea las células musculares lisas. En la serosa, versican se encontró en el tejido conectivo subyacente al mesotelio mostrando una distribución comparable a otros proteoglicanos analizados. Este análisis confirma la presencia de versican en la túnica adventicia y muscular de los vasos sanguíneos y endoneuro de fascículos nerviosos periféricos.

En la tabla número 7 se encuentra resumidos la distribución de colágenos y proteoglicanos en diferentes regiones de la TU.

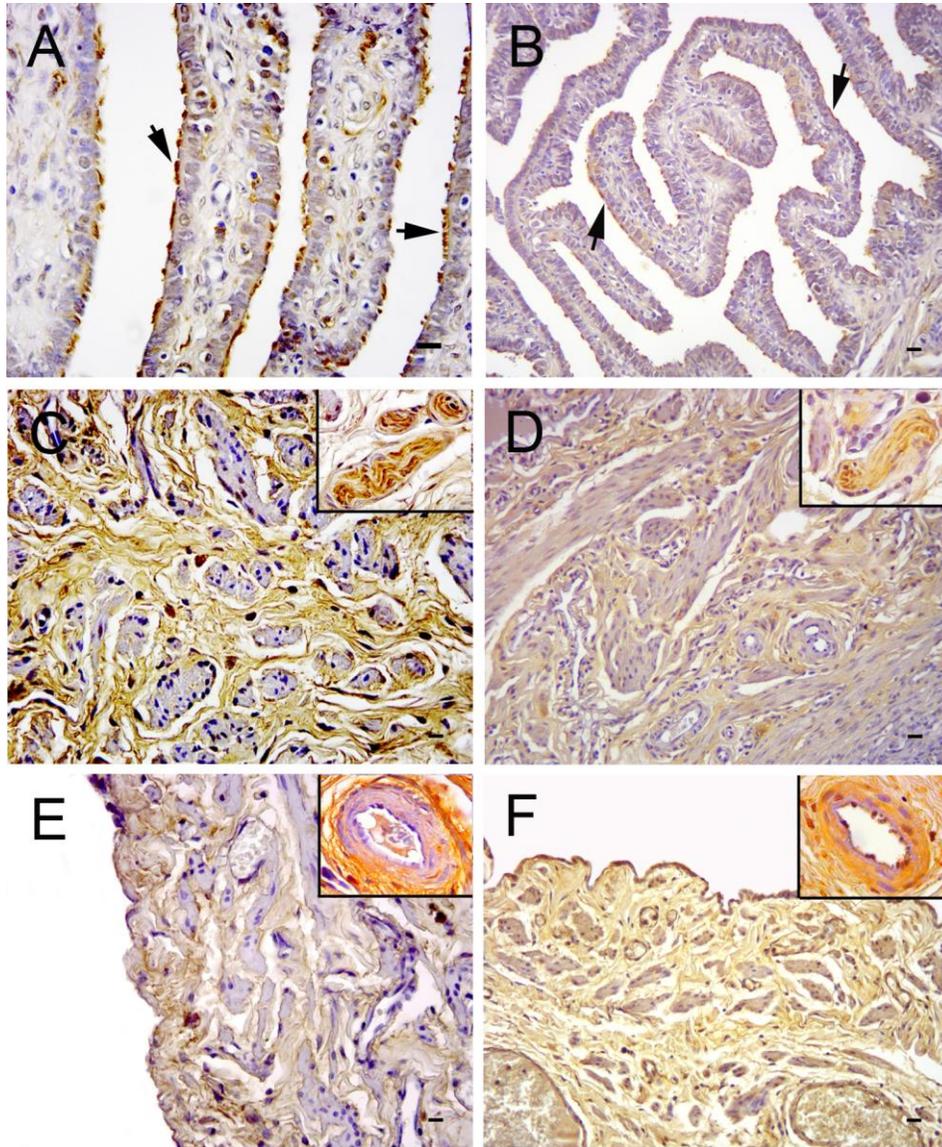


Fig. 29 Inmunohistoquímica de proteoglicano versican. En esta imagen se observó la expresión de versican en la fase folicular (A, C, E) y fase lútea (B, D, F). (A, B) Existe una inmunomarcación positiva en la superficie epitelial apical (flechas). (C, D) En la capa muscular la reacción estuvo circunscrita principalmente a nivel del tejido conectivo y musculo liso. Nótese la reacción positiva en fascículos nerviosos periféricos (insertos). (E, F) En la serosa se observó una inmunoreacción positiva en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Los insertos corresponden a una inmunomarcación positiva en los vasos sanguíneos. E: epitelio; lp: lamina propia. Barra calibradora 20  $\mu$ m.

Moléculas de la MEC	Colágeno I		Colágeno III		Biglican		Versican		Decorin		Fibromodulin	
	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L
<b>Fase del ciclo menstrual</b>												
<b>MUCOSA</b>												
• Superficie apical del epitelio.	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
• Lámina propia	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
• Alrededor de los vasos sanguíneos	+	+	+	+	-/+	-/+	-	-	-	-	+	+
<b>CAPA MUSCULAR</b>												
• Tejido conectivo	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
• Alrededor de los vasos sanguíneos	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
• Musculo liso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>SEROSA</b>												
• Alrededor de los vasos sanguíneos	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
• Tejido conectivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• Nervios	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabla 7: Distribución de colágenos y proteoglicanos en diferentes regiones de la TU.

F: Fase Folicular

L: Fase lútea

(+): Presencia de la molécula

(-): Ausencia de la molécula

(-/+): Sólo algunos

# **DISCUSIÓN**

El objetivo de la presente tesis Doctoral fue establecer los patrones estructurales y arquitecturales, histoquímicos e inmunohistoquímicos, de los componentes de la MEC de la trompa uterina humana, en las distintas fases del ciclo menstrual para su utilización como modelos bioestructurales aplicables en protocolos de ingeniería tisular. La importancia de estas moléculas de la MEC radica en que poseen un rol importante durante la función normal del útero en la implantación embrionaria y embarazo [60, 71, 81]. Además, estas moléculas se caracterizan por proveer propiedades estructurales y biomecánicas a muchos órganos del organismo humano [38, 39], e inclusive son importantes en el proceso de cicatrización [167].

En general, todos los tejidos conectivos están compuestos de células y MEC, las cuales incluyen agua y una amplia variedad de macromoléculas. Una de las macromoléculas más importantes en determinar las propiedades biomecánicas de tejidos y órganos son los colágenos, especialmente los tipos I, II y III [38, 39]. En este contexto, nuestro estudio demuestra una amplia distribución de los colágenos I y III en la MEC de la TU por técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas. Nuestros resultados confirmaron la presencia de colágeno I y III desde la capa mucosa a la serosa en las TUs estudiadas, siendo la inmunomarcación para colágeno I más abundante que la reacción observada para el colágeno III. En esta línea, destaca una expresión positiva de colágenos en la túnica muscular y adventicia de vasos sanguíneos de diferente calibre, así como también a nivel del endoneuro de nervios periféricos observados a este nivel. Estos resultados son similares a los descritos por Schultka et al (1993) [44] quien estudió la distribución de colágenos (I, III, IV, V, VI) en la mucosa de TUs humanas

de mujeres de 32 a 67 años. Los autores concluyen que el tejido conectivo de la TU está compuesto por importantes proteínas con una función estructural, las cuales forman una complicada arquitectura de la MEC que cambia debido al proceso de envejecimiento. Sin embargo, el estudio posee algunas limitaciones, ya que no se dataron a que fase del ciclo menstrual correspondían (folicular o lútea) las TUs estudiadas, y sólo se describe la expresión de las moléculas antes mencionadas en la mucosa, y no en las otras regiones histológicas del órgano. En este contexto, Ohashi et al (2003) [45] demostró la expresión de colágeno I en el oviducto de codorniz japonesa por PCR e inmunofluorescencia. Nuestros resultados, junto con los datos previamente descritos en otras especies sugieren que los colágenos I y III son las principales moléculas que organizan la citoarquitectura de las capas histológicas de la TU. Además del rol estructural, es probable que estas moléculas y su organización tridimensional este en estrecha relación con la compleja biomecánica del órgano, necesaria para el transporte de gametos y cigoto, especialmente durante la edad fértil. Curiosamente, estas moléculas tienen una estructura y distribución constante durante la edad fértil, no observándose variaciones en el depósito o distribución de estas moléculas entre la fase folicular o lútea. Sin embargo, es necesario realizar estudios de proteómica para poder determinar con exactitud posibles cambios en la concentración de éstas y otras moléculas de la MEC de la TU humana.

Por otro lado, es ampliamente conocido que los proteoglicanos están involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo mantención estructural, remodelación, adhesión celular y transmisión de señales [50, 57]. En contraste, a pesar de la amplia información existente sobre la

expresión y funciones de los proteoglicanos en modelos animales, el rol de estas moléculas en el sistema reproductivo femenino humano, no ha sido determinado [168]. En este sentido, nuestro estudio confirmó la expresión diferencial de proteoglicanos ácidos por técnica histoquímica de azul de alcian pH 2.5 y específicamente por inmunohistoquímica.

El método histoquímico de azul de alcian reveló una amplia distribución de proteoglicanos ácidos en las 3 capas histológicas de la TU: mucosa, muscular y serosa. De forma similar a otras mucosas, azul de alcian fue observado en la superficie de las células secretoras, sugiriendo la síntesis de mucopolisácaridos por estas células, aspecto característico de la mucosa de órganos reproductivos (útero y endocervix) [15]. En el caso del proteoglicano biglican, este SLRP está compuesto de una proteína central y 2 cadenas de glicosaminoglicanos de condroitín o dermatán sulfato [50]. Cabe hacer notar que esta molécula no es específica de un determinado tejido u órgano, de hecho su expresión ha sido descrita a nivel del útero [56], placenta [57], pulmones fetales humanos [58] y cartílago [49], entre otros. El análisis inmunohistoquímico de biglican en las TUs humanas demostró que esta molécula se expresó en la túnica muscular y adventicia de vasos sanguíneos de diferente calibre. Adicionalmente, en la serosa se observó una fuerte inmunomarcación de esta molécula en el tejido conectivo subyacente al mesotelio. Este patrón de inmunomarcación en los vasos sanguíneos es similar a lo observado en pulmones fetales humanos [58]. Algunos estudios *in vitro* avalan nuestros hallazgos, ya que se ha descrito la expresión de biglican por células endoteliales y musculo liso [59]. Cabe hacer notar que Biglican es una molécula que de forma clásica se ha asociado a la fibrillogénesis de las

fibras de colágeno, mostrando una distribución similar de ambas moléculas [56, 60, 61]. Hallazgos similares fueron observados en trabajos de ingeniería tisular en cartílago elástico bajo condiciones de cultivo y cartílago elástico humano [49]. Curiosamente, en este estudio la asociación entre biglican y colágenos sólo ocurre en los vasos sanguíneos y serosa, sugiriendo que biglican podría jugar un rol en la organización estructural del colágeno a este nivel, y por tanto la organización tridimensional del colágeno I y III en las otras regiones histológicas de la TU (mucosa y muscular), podría estar relacionada a la expresión de otras moléculas de la MEC.

Decorin es un proteoglicano que pertenece al grupo de las SLRP esta molécula está compuesta de una proteína central unida a cadenas de glicosaminoglicanos condroitín o dermatán sulfato [62]. Cabe señalar que Decorin ha sido descrita en la literatura como una molécula promiscua debido a que interactúa con diversas moléculas de la MEC, moléculas de adhesión y receptores [51]. Además, existe evidencia que los proteoglicanos decorin y biglican se unen TGF- $\beta$ , modulando su actividad como un mediador de la inhibición del crecimiento [63-65]. Decorin también está asociado con fibras de colágeno y ha sido descrito que interactúa con colágeno I y VI, soportando la hipótesis que este proteoglicano juega un rol en el ensamblaje de la MEC [66, 67]. Sin embargo, existe evidencia contradictoria sobre si decorin participa en la formación de fibras de colágeno delgadas o gruesas [56, 68, 69]. Recientemente, estudios *in vitro* señalan que se observaron fibras de colágeno I poco organizadas sintetizadas por células madre mesenquimáticas en hidrogeles de fibrina-agarosa, este hallazgo estuvo asociado a la falta o ausencia de decorin [169]. Otro estudio *in vitro*, demostró que la

incorporación de decorin durante la formación de hidrogeles de colágeno I resultó en una mejor organización del hidrogel resultante [170]. En este sentido, ambos estudios *in vitro* ponen de relieve la importancia de decorin en el ensamblaje del colágeno I. A este respecto, los resultados de esta Tesis Doctoral muestran una distribución similar de colágeno I y decorin en la MEC que rodea a bandas de musculo liso de la capa muscular y la MEC subyacente al mesotelio. El patrón antes mencionado en la serosa fue similar a lo observado con biglican. También, destaca una fuerte inmunomarcación de decorin en el endoneuro de fascículos nerviosos periféricos, ubicados principalmente en la capa muscular y serosa. Curiosamente, decorin fue negativo en la túnica muscular de vasos sanguíneos, donde biglican se expresó de forma predominante y se observó un patrón de expresión similar al de colágeno III. En este contexto, es posible que decorin este relacionado con la organización de colágeno I en la MEC de la TU y en el endoneuro de nervios periféricos.

Fibromodulin es un SLRP el cual se demostró que interactúa con los colágenos I, II, VI y IX en *solid phase binding assays* [70], durante la fibrilogénesis de estas fibras y puede actuar como reservorio de factores de crecimiento [52, 68, 71]. Nuestros resultados mostraron una distribución de fibromodulin en la lámina propia (mucosa) y en el tejido conectivo de la capa muscular y serosa. Dicho patrón de expresión podría estar relacionado con la organización del colágeno I que posee una distribución similar. Levens et al (2005) [72] señaló que la hormona liberadora de gonadotrofina (GRH) cambia la expresión de fibromodulin en el miometrio en la fase proliferativa y secretora del ciclo menstrual humano,

sugiriendo que la expresión de esta molécula está bajo influencia de las hormonas ováricas.

Versican es un PG que pertenece a la familia de las hialectinas, cuyas propiedades de interacción molecular se han asociado con la formación de matrices altamente hidratadas y laxas [73]. Versican interactúa con diversas moléculas de la MEC y juega un rol importante en su ensamblaje [49, 74]. Westergren-Thorsson et al (1998) [75] señalan que la estructura de versican, la cual posee cadenas de condroitín/dermatán sulfato y la capacidad de generar agregados con hialuronan, permiten la inmovilización de agua, de modo que se incrementa la presión entre las fibras de colágeno. Observaciones *in vitro* indican que versican inhibe la adhesión célula-sustrato de fibroblastos primarios a colágeno I, fibronectina, vibronectina, y laminina [76]. En la TU, versican estuvo distribuida en el tejido conectivo que rodea las células musculares lisas de la capa muscular y serosa. Adicionalmente, esta Tesis Doctoral describe por primera vez, la presencia de versican en la superficie epitelial apical de la mucosa. Esta expresión podría estar relacionada con las propiedades de adhesión celular [171, 172]. Sin embargo, no existe información relacionada con la distribución y posibles roles de versican en la TU en humanos o modelos animales, y por tanto la expresión de esta molécula debería ser estudiada en más profundidad en condiciones normales, así como también en condiciones patológicas.

La síntesis de moléculas de la MEC (fibras colágenas), implica diversos procesos moleculares y enzimáticos, los cuales pueden ser alterados por mutaciones, generando enfermedades genéticas y síndromes [173]. Las mutaciones que afectan la síntesis del colágeno tipo I originan osteogénesis

imperfecta [12]. Por otro lado, mutaciones en genes que codifican los colágenos II y III derivan en condrodisplasias y síndrome de Ehlers-Danlos, respectivamente [12]. Estas enfermedades genéticas afectan directamente la calidad de vida de muchos pacientes en el mundo entero. En el caso de síndrome de Ehlers-Danlos, los pacientes sufren enfermedades del tejido conectivo, fragilidad vascular, hiper movilidad de articulaciones y hiperextensibilidad de la piel [3, 36, 37]. Además, el síndrome de Ehlers-Danlos de tipo vascular está asociado con una serie de alteraciones estructurales y funcionales en diversos órganos como el colon, hemotorax [174] y ruptura del útero grávido [36]. Sin embargo, no existe evidencia publicada del potencial impacto de mutaciones que afectan los genes que codifican la expresión de moléculas de la MEC y su relación con la organización estructural y función en la TU humana. En este contexto, experimentos de gene ablation podrían contribuir a dilucidar la función y efectos posibles de moléculas de la MEC en la TU.

Los nervios periféricos son órganos esenciales para la función normal de la TU, los fascículos nerviosos son fácilmente observables en la capa muscular y serosa. Curiosamente, en esta Tesis Doctoral por primera vez, se ha descrito una expresión positiva de decorin, fibromodulin y versican en el endoneuro de pequeños fascículos nerviosos, donde biglican fue negativo. En general, los proteoglicanos han sido descritos como componentes normales del sistema nervioso central, donde estas moléculas mantienen el microambiente extracelular [175, 176]. En el caso de los nervios periféricos la MEC juega un rol estructural crucial [15], pero además poseen un rol clave en la regeneración nerviosa [127, 166]. En este sentido, es necesario una mayor indagación para determinar el

verdadero rol de decorin, fibromodulin, versican y otras moléculas de la MEC en nervios periféricos nativos y especialmente durante la regeneración.

Como resultado final de los estudios que se llevaron a cabo en la presente Tesis Doctoral, nuestro trabajo provee nueva evidencia histoquímica e inmunohistoquímica sobre el depósito y distribución tisular de los componentes fibrilares (colágeno I, III y fibras elásticas) y no fibrilares (decorin, biglican, fibromodulin, versican y glicoproteínas) de la MEC de la TU. Cabe señalar, que no existieron diferencias aparentes en el depósito y distribución de moléculas de la MEC entre la fase folicular y lútea. Sin embargo, se observó una distribución diferencial de estas moléculas en diferentes capas de la TU: mucosa, muscular y serosa. Dichas diferencias podrían estar relacionadas con proveer las características estructurales y propiedades biomecánicas necesarias para el transporte oviductal, fertilización exitosa y etapas tempranas de la embriogénesis. Sin embargo, son necesarias futuras investigaciones mediante técnicas de biología celular y molecular para dilucidar el rol de las moléculas de la MEC de la TU en condiciones normales y patológicas.

En relación a la IT de la TU humana, no existen estrategias definidas para la generación de sustitutos para la reparación o reemplazo de este órgano. No obstante, la estructura de la TU puede ser afectada por diversas patologías que pueden llevar a un daño parcial o pérdida total del órgano y en algunos casos una alteración de la fertilidad [3, 4]. Un área importante para una potencial aplicación de la IT en mujeres es la cirugía reconstructiva del aparato reproductor femenino [5]. En este sentido, el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral provee los parámetros morfológicos, celulares, histoquímicos e inmunohistoquímicos

necesarios para la construcción de sustitutos de TU por diversas estrategias de IT. En primer lugar, las investigaciones futuras en este campo deberán estar enfocadas en el desarrollo de protocolos de aislamiento y cultivo de las células epiteliales y estromales que constituyen este órgano, así como también la diferenciación de células madre a estas estirpes con fines terapéuticos. En relación a los biomateriales, nuestros resultados demuestran que las fibras colágenas son el componente estructural más abundante del órgano, mientras que las moléculas no fibrilares estudiadas han mostrado una expresión diferencial entre las diferentes capas histológicas. En este contexto, nuestros resultados sugieren que los hidrogeles de colágeno I podrían ser utilizados para la generación de posibles sustitutos tridimensionales de TU humana, los cuales deberán tener una estructura tubular, la cual permite el cultivo de células estromales y epiteliales con altos índices de proliferación y función. Por último, las características histológicas, moleculares de la MEC y las dimensiones anatómicas de la TU humana demuestran la idoneidad de este órgano para ser sometido a protocolos de descelularización. Actualmente la descelularización química es considerada un método eficaz para la generación de matrices [140] y diversos sustitutos *in vitro* [129, 130, 134, 136-139]. En algunos casos, estas matrices acelulares han permitido la recelularización y regeneración tisular de diversos tejidos *in vivo* [140, 152, 177]. Además, la utilización de matrices acelulares obtenidas de otros tejidos y órganos debería ser estudiada para determinar su potencial utilidad en la reparación de la TU.

# **CONCLUSIONES**

1.- El estudio histoquímico e inmunohistoquímico del componente fibrilar de la MEC (Colágeno I y III) mostró una amplia distribución en el intersticio de la TU, no existiendo diferencias aparentes entre la fase folicular y lútea. La lámina propia posee una inmunomarcación positiva para colágenos, estando sus fibras organizadas de forma paralela. En la capa muscular se observó una inmunomarcación positiva en el tejido conectivo que rodea a las células musculares lisas. Todos los colágenos estudiados fueron identificados en la serosa.

2.- El estudio histoquímico e inmunohistoquímico del componente no fibrilar de la MEC (decorin, biglican, fibromodulin y versican) señaló una distribución diferencial de proteoglicanos en las 3 capas de la TU, no existiendo diferencias aparentes entre la fase folicular y lútea. En la mucosa, se observó una inmunomarcación positiva de versican y fibromodulin en la superficie epitelial apical, mientras que decorin y fibromodulin fueron observados en la lámina propia. Versican y decorin fueron advertidos en el estroma de la capa muscular. Todos los proteoglicanos estudiados fueron identificados en la serosa.

3.- El estudio histoquímico e inmunohistoquímico del componente fibrilar y no fibrilar de fascículos nerviosos periféricos de la TU mostró una expresión positiva para colágenos (I y III) en el endoneuro y perineuro y de proteoglicanos (decorin, versican y fibromodulin) principalmente en el endoneuro. Los fascículos nerviosos se observaron principalmente en la capa muscular y serosa.

4.- El estudio histoquímico e inmunohistoquímico del componente fibrilar y no fibrilar de vasos sanguíneos de la TU mostró una expresión positiva de colágenos (I y III) y proteoglicanos (decorin, fibromodulin, versican) principalmente en la adventicia. Curiosamente, se observó una inmunomarcación positiva para biglican restringida a la pared de vasos sanguíneos de diferente calibre tanto de la capa muscular como serosa.

5.- La distribución diferencial de las moléculas de la matriz extracelular en diferentes capas de TU podrían estar relacionadas con funciones estructurales y biomecánicas específicas necesarias para el transporte oviductal, una fecundación exitosa y etapas tempranas de la embriogénesis. Sin embargo, son necesarias investigaciones futuras mediante técnicas de biología celular y molecular para dilucidar el rol de las moléculas de la MEC de la TU en condiciones normales y patológicas.

6.- En relación a la IT de la TU humana, no existen estrategias definidas para la generación de sustitutos para la reparación o reemplazo de este órgano. En este contexto, nuestros resultados proveen parámetros morfológicos, celulares, histoquímicos e inmunohistoquímicos necesarios para la construcción de sustitutos de TU por diversas estrategias de IT. En primer lugar, las investigaciones futuras en este campo deberán estar enfocadas en el desarrollo de protocolos de aislamiento y cultivo de las células epiteliales y estromales que constituyen este órgano, así como también la diferenciación de células madre a

estas estirpes con fines terapéuticos. En relación a los biomateriales, nuestros resultados demuestran que las fibras colágenas son el componente estructural más abundante del órgano. En este contexto, nuestros resultados sugieren que los hidrogeles de colágeno I podrían ser utilizados para la generación de posibles sustitutos tridimensionales de TU humana, los cuales deberán tener una estructura tubular. Por último, las características histológicas, moleculares de la MEC y las dimensiones anatómicas de la TU humana demuestran la idoneidad de este órgano para ser sometido a protocolos de descelularización química. Además, la utilización de matrices acelulares obtenidas de otros tejidos y órganos debería ser estudiada para determinar su potencial utilidad en la reparación de la TU.

**REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

1. Campos Muñoz, A., *Cuerpo, histología y medicina. Discurso de ingreso. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid* 2004.
2. CAMPOS, F., *Generation of biomimetic tissue-like biomaterials with controlled biomechanical and biological properties for tissue engineering applications*, in *Departamento de Histología*. 2017, Universidad de Granada: Granada.
3. Lanza R, L.R.V.J., *Principles of tissue engineering*. 3rd edition† ed. 2007: Academic Press.
4. Kuo, C.Y., et al., *Bioengineering Strategies to Treat Female Infertility*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017. **23**(3): p. 294-306.
5. Schenke-Layland, K. and S.Y. Brucker, *Prospects for regenerative medicine approaches in women's health*. *J Anat*, 2015. **227**(6): p. 781-5.
6. Carlson, B.M. and P.N. Kantaputra, *Embriología humana y biología del desarrollo [5ª ed.]*. 5ª ed ed. 2014, Ámsterdam ; Barcelona ; Madrid etc.: Elsevier. XIII, 505 p.
7. Sadler, T.W., et al., *Embriología médica : con orientación clínica [10ª ed.]*. 10ª ed ed. 2007, Buenos Aires ; Madrid etc.: Editorial Médica Panamericana. 3 p. de lám., XIV, 386 p.
8. Moore, K.L., et al., *Embriología clínica [10ª ed.]*. 10ª ed ed. 2016, Ámsterdam ; Barcelona ; Madrid etc.: Elsevier. XIX, 523 p.
9. Tuchmann Duplessis, H. and P. Haegel, *Embriología : cuadernos prácticos. 2, Organogénesis*. 2{487} ed. 1982, Barcelona: Toray - Masson. 154 p.
10. Roviére, H. and A. Delmas, *Anatomía humana: Descriptiva, topográfica y funcional*, ed. edición. Vol. 2. 2005, Barcelona, España: Masson, S. A.
11. Snell, R., *Anatomía clínica para estudiantes de Medicina*. 6ta edición ed. 2002, México: McGraw- Hill.
12. Kierszenbaum, A.L. and L.L. Tres, *Histología y biología celular : introducción a la anatomía patológica : tercera edición*. 3a ed ed. 2012, Barcelona etc.: Elsevier. XV, 700 p.
13. Croxatto, H.B., *Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube*. *Reprod Biomed Online*, 2002. **4**(2): p. 160-9.
14. Cunningham, G., et al., *Williams Obstetricia*. 24 Edición ed. 2014, México: McGraw-Hill.
15. Mills, S.E., *Histology for pathologists*. 4th ed. ed. 2012, United States: Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2012.
16. Gray, H., T.P. Pick, and R. Howden, *Anatomy, descriptive and surgical*. 2007, Raleigh: Sweetwater. 1257 p.
17. Ross, M. and W. Pawlina, *Histology: A text and atlas*. 6th edition† ed. 2010: LWW.
18. Pérez Sánchez, A., *Ginecología*. 2{00AA} ed ed. 1995, Santiago de Chile: Técnicas Mediterráneo. XV, 631 p.
19. Krstic, R.V., *Human microscopic anatomy : an atlas for students of medicine and biology*. 2nd print. correct. ed. 2010, Berlin etc: Springer-Verlag. XVI, 616 p.

20. Gartner, L.P. and J.L. Hiatt, *Atlas en color y texto de histología*. 6a ed ed. 2014, México: Médica Panamericana. XVIII, 517 p.
21. Hunter, *The fallopian tube. Their role in fertility and infertility*. 1988: Springer-Verlag.
22. Smith, T.T. and R. Yanagimachi, *The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival*. Biol Reprod, 1990. **42**(3): p. 450-7.
23. Revah, I., et al., *Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties*. Biol Reprod, 2000. **62**(4): p. 1010-5.
24. Ham, A. and D. Cormack, *Tratado de Histología*. Octava edición ed. 1984, México: Interamericana.
25. Snell, R., *Anatomía clínica para estudiantes de Medicina*. 6ta edición ed. 2002, México: Mcgraw- Hill.
26. Bloom, F., *Tratado de Histología*. Segunda edición ed. 1995, Madrid: Interamericana.
27. Croxatto, H.B., et al., *Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak*. Am J Obstet Gynecol, 1978. **132**(6): p. 629-34.
28. Moore, G.D. and H.B. Croxatto, *Effects of delayed transfer and treatment with oestrogen on the transport of microspheres by the rat oviduct*. J Reprod Fertil, 1988. **83**(2): p. 795-802.
29. Velasquez, L.A., et al., *PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human Fallopian tube: possible role of embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus*. Hum Reprod, 2001. **16**(8): p. 1583-7.
30. Diaz, P.S., et al., *Differential expression of extracellular matrix components in the Fallopian tubes throughout the menstrual cycle*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2012. **10**: p. 8.
31. Junqueira, L.C., et al., *Histología básica : [texto y atlas]*. 6ª ed. 2011, Barcelona etc.: Elsevier Masson. XIII, 331 p. de lám., 488 p.
32. Kerrigan, J.J., J.P. Mansell, and J.R. Sandy, *Matrix turnover*. J Orthod, 2000. **27**(3): p. 227-33.
33. Hay, *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Publishers, New York. Second Edition ed. 1991, New York: Springer US.
34. Høcker, U., K. Nybakken, and N. Perrimon, *Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(7): p. 530-41.
35. Silver, F.H., J.W. Freeman, and G.P. Seehra, *Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties*. Journal of Biomechanics, 2003. **36**(10): p. 1529-1553.
36. Byers P, C.W.G., *Osteogenesis imperfecta*, in *Connective tissue and its heritable disorders Molecular, Genetic, and Medical Aspects*. 2002, Wiley-Liss: New York. p. 385 e 430.
37. Steinmann B, R.P.M.S.-F.A., *The Ehlers-Danlos syndrome*, in *Connective tissue and its heritable disorder Molecular, genetic, and medical aspects*, S.B. Royce Pm, Editor. 2002, Wiley- Liss: New York.

38. Ushiki, T., *Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint*. Archives of Histology and Cytology, 2002. **65**(2): p. 109-126.
39. Suki, B., et al., *Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces*. Journal of Applied Physiology, 2005. **98**(5): p. 1892-1899.
40. Schultka, R., *DETECTION AND ANALYSIS OF ALDEHYDE FUCHSIN POSITIVE FIBERS IN THE CONNECTIVE-TISSUE OF THE HUMAN OVIDUCTAL MUCOSA .1. PRELIMINARY INVESTIGATIONS AND DEMONSTRATION OF THE MORPHOLOGICAL SUBSTRATUM*. Acta Histochemica, 1980. **67**(1): p. 54-75.
41. Schultka, R., *Biomorphosis of the mucosa of human oviducts: contribution to the problem of morphology and aging of the uterine tubes. I. Introduction, literature, first results*. Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch, 1981. **127**(2): p. 210-45.
42. Schultka, R., *DETECTION AND ANALYSIS OF ALDEHYDE FUCHSIN POSITIVE FIBERS IN THE CONNECTIVE-TISSUE OF THE HUMAN OVIDUCTAL MUCOSA .2. ON THE BIOMORPHOSIS AND STRUCTURAL IDENTIFICATION OF THE MORPHOLOGICAL SUBSTRATUM*. Acta Histochemica, 1981. **68**(1): p. 48-78.
43. Schultka, R., et al., *ON THE CONNECTIVE-TISSUE OF THE HUMAN OVIDUCTAL MUCOSA - POLARIZATION MICROSCOPIC DETECTION OF COLLAGEN WITH SOLAMINROT-4B*. Acta Histochemica, 1989. **86**(2): p. 159-&.
44. Schultka, R., et al., *AGE-DEPENDENT CHANGES OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL DISTRIBUTION OF VARIOUS COLLAGEN TYPES AND STRUCTURAL GLYCOPROTEINS IN THE HUMAN UTERINE TUBE*. Acta Histochemica, 1993. **95**(2): p. 139-153.
45. Ohashi, H., T. Okamoto, and Y. Yoshimura, *Changes in the type I collagen mRNA expression in the isthmus during the passage of egg through the oviduct in Japanese quail*. Journal of Poultry Science, 2003. **40**(4): p. 267-273.
46. Leeson, T.S., C.R. Leeson, and A.A. Paparo, *Texto-atlas de histología*. 1996, México etc.: Interamericana-McGraw-Hill. XIV, 741 p.
47. Kiernan, J.A., *Histological and histochemical methods : theory and practice*. 5th ed ed. 2015, Bloxham UK: Scion. xv, 571 p.
48. Suvarna, S.K., C. Layton, and J.D. Bancroft, *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7th ed ed. 2012, Oxford: Churchill Livingstone. XIV, 637 p.
49. Garcia-Martinez, L., et al., *Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels*. Histochemistry and Cell Biology, 2017. **147**(1): p. 83-95.
50. Kreis T, V.R., *Extracelullar matrix, anchor, and adhesion proteins*. 2nd edition ed. 1999: Oxford University Press.
51. McEwan, P.A., et al., *Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans*. Journal of Structural Biology, 2006. **155**(2): p. 294-305.
52. Hocking, A.M., T. Shinomura, and D.J. McQuillan, *Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix*. Matrix Biology, 1998. **17**(1): p. 1-19.
53. Danielson, K.G., et al., *Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility*. Journal of Cell Biology, 1997. **136**(3): p. 729-743.

54. Xu, T.S., et al., *Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice*. Nature Genetics, 1998. **20**(1): p. 78-82.
55. Ameye, L., et al., *Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis*. Faseb Journal, 2002. **16**(7): p. 8.
56. San Martin, S., et al., *Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice*. Reproduction, 2003. **125**(4): p. 585-595.
57. Giachini, F.R.C., et al., *Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation*. Journal of Anatomy, 2008. **212**(1): p. 31-41.
58. Godoy-Guzman, C., S. San Martin, and J. Pereda, *Proteoglycan and collagen expression during human air conducting system development*. European Journal of Histochemistry, 2012. **56**(3): p. 179-184.
59. Jarvelainen, H.T., et al., *DIFFERENTIAL EXPRESSION OF SMALL CHONDROITIN DERMATAN SULFATE PROTEOGLYCANS, PG-I BIGLYCAN AND PG-II DECORIN, BY VASCULAR SMOOTH-MUSCLE AND ENDOTHELIAL-CELLS IN CULTURE*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(34): p. 23274-23281.
60. San Martin, S. and T.M.T. Zorn, *The small proteoglycan biglycan is associated with thick collagen fibrils in the mouse decidua*. Cellular and Molecular Biology, 2003. **49**(4): p. 673-678.
61. Schonherr, E., et al., *INTERACTION OF BIGLYCAN WITH TYPE-I COLLAGEN*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(6): p. 2776-2783.
62. Cheng, F., et al., *PATTERNS OF URONOSYL EPIMERIZATION AND 4-/6-O-SULFATION IN CHONDROITIN/DERMATAN SULFATE FROM DECORIN AND BIGLYCAN OF VARIOUS BOVINE-TISSUES*. Glycobiology, 1994. **4**(5): p. 685-696.
63. Yamaguchi, Y., D.M. Mann, and E. Ruoslahti, *NEGATIVE REGULATION OF TRANSFORMING GROWTH-FACTOR-BETA BY THE PROTEOGLYCAN DECORIN*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 281-284.
64. Hausser, H., et al., *SELECTIVE INACTIVITY OF TGF-BETA DECORIN COMPLEXES*. Febs Letters, 1994. **353**(3): p. 243-245.
65. Kolb, M., et al., *Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2001. **280**(6): p. L1327-L1334.
66. Scott, P.G., et al., *Crystal structure of the biglycan dimer and evidence that dimerization is essential for folding and stability of class I small leucine-rich repeat proteoglycans*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(19): p. 13324-13332.
67. Bidanset, D.J., et al., *BINDING OF THE PROTEOGLYCAN DECORIN TO COLLAGEN TYPE-VI*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(8): p. 5250-5256.
68. Vogel, K.G., M. Paulsson, and D. Heinegard, *SPECIFIC-INHIBITION OF TYPE-I AND TYPE-II COLLAGEN FIBRILLOGENESIS BY THE SMALL PROTEOGLYCAN OF TENDON*. Biochemical Journal, 1984. **223**(3): p. 587-597.
69. Uldbjerg, N. and C.C. Danielsen, *A STUDY OF THE INTERACTION INVITRO BETWEEN TYPE-I COLLAGEN AND A SMALL DERMATAN SULFATE PROTEOGLYCAN*. Biochemical Journal, 1988. **251**(3): p. 643-648.

70. Hedbom, E. and D. Heinegard, *BINDING OF FIBROMODULIN AND DECORIN TO SEPARATE SITES ON FIBRILLAR COLLAGENS*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(36): p. 27307-27312.
71. Salgado, R.M., et al., *The Estrous Cycle Modulates Small Leucine-Rich Proteoglycans Expression in Mouse Uterine Tissues*. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 2009. **292**(1): p. 138-153.
72. Levens, E., et al., *Fibromodulin is expressed in leiomyoma and myometrium and regulated by gonadotropin-releasing hormone analogue therapy and TGF-beta through Smad and MAPK-mediated signalling*. Molecular Human Reproduction, 2005. **11**(7): p. 489-494.
73. Margolis, R.U. and R.K. Margolis, *AGGRECAN-VERSICAN-NEUROCAN FAMILY OF PROTEOGLYCAN*s. Extracellular Matrix Components, 1994. **245**: p. 105-126.
74. Matsumoto, K., et al., *Identification and characterization of versican/PG-M aggregates in cartilage*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(26): p. 18257-18263.
75. Westergren-Thorsson, G., et al., *Differential expressions of mRNA for proteoglycans, collagens and transforming growth factor-beta in the human cervix during pregnancy and involution*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 1998. **1406**(2): p. 203-213.
76. Yamagata, M., et al., *SELECTIVE DISTRIBUTIONS OF PROTEOGLYCANs AND THEIR LIGANDS IN PERICELLULAR MATRIX OF CULTURED FIBROBLASTS - IMPLICATIONS FOR THEIR ROLES IN CELL-SUBSTRATUM ADHESION*. Journal of Cell Science, 1993. **106**: p. 55-65.
77. Einspanier, R., et al., *The mammalian oviduct: Aspects on auto- and paracrine mechanisms*. Reproduction in Domestic Animals, 2000. **35**(3-4): p. 125-128.
78. Aplin, J.D., A.K. Charlton, and S. Ayad, *AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF HUMAN ENDOMETRIAL EXTRACELLULAR-MATRIX DURING THE MENSTRUAL-CYCLE AND 1ST TRIMESTER OF PREGNANCY*. Cell and Tissue Research, 1988. **253**(1): p. 231-240.
79. Greca, C.P.S., P.A. Abrahamsohn, and T.M.T. Zorn, *Ultrastructural cytochemical study of proteoglycans in the endometrium of pregnant mice using cationic dyes*. Tissue & Cell, 1998. **30**(3): p. 304-311.
80. Greca, C.D.S., et al., *Ultrastructural cytochemical characterization of collagen-associated proteoglycans in the endometrium of mice*. Anatomical Record, 2000. **259**(4): p. 413-423.
81. San Martin, S., M. Soto-Suazo, and T.M.T. Zorn, *Distribution of versican and hyaluronan in the mouse uterus during decidualization*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2003. **36**(8): p. 1067-1071.
82. Williams, J.W. and F.G. Cunningham, *Obstetricia : Williams*. 23\* ed. 2015, México etc.: McGraw-Hill. XVIII, 1356 p.
83. Rondón-Tapia Marta R.-V.E., Torres-Cepeda Duly, *Paratubal cyst torsion. Case report. rev peru ginecol obstet* 2016. **62**(4).
84. Goktolga, U., et al., *Isolated torsion of fallopian tube in a premenarcheal 12-year-old girl*. J Obstet Gynaecol Res, 2007. **33**(2): p. 215-7.

85. Alcántara Vázquez A , R.H.G. and M.C.A. Hernández Gonzále M, *Tumor adenomatoide de la trompa uterina. Estudio inmunohistoquímico de la histogénesis y revisión del cuadro clínico-patológico a propósito de un caso.* Revista Medica del Hospital General 2003. **66**(1): p. 33-36.
86. Piek, J.M.J., et al., *BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis.* Gynecologic Oncology, 2003. **90**(2): p. 491-491.
87. Dietl, J., *Revisiting the pathogenesis of ovarian cancer: the central role of the fallopian tube.* Archives of Gynecology and Obstetrics, 2014. **289**(2): p. 241-246.
88. Reade, C.J., et al., *The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift.* Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC, 2014. **36**(2): p. 133-140.
89. Stevens, A. and J. Lowe, *Anatomía patológica.* 2\* ed ed. 2001, Madrid etc.: Harcourt. XV, 652 p.
90. Walker, J.J., *Ectopic pregnancy.* Clin Obstet Gynecol, 2007. **50**(1): p. 89-99.
91. Varma, R. and J. Gupta, *Tubal ectopic pregnancy.* BMJ Clin Evid, 2009. **2009**.
92. Shaw, J.L., et al., *Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy.* Hum Reprod Update, 2010. **16**(4): p. 432-44.
93. Leke, R.J., et al., *Ectopic pregnancy in Africa: a population-based study.* Obstet Gynecol, 2004. **103**(4): p. 692-7.
94. Corpa, J.M., *Ectopic pregnancy in animals and humans.* Reproduction, 2006. **131**(4): p. 631-40.
95. Jerome, C.P. and A.G. Hendrickx, *A tubal pregnancy in a rhesus monkey (Macaca mulatta).* Vet Pathol, 1982. **19**(3): p. 239-45.
96. De Cecco, L., et al., *Biology of nidation and ectopic implantation.* Acta Eur Fertil, 1984. **15**(5): p. 347-55.
97. Moore, G.D., C.A. Eddy, and C.J. Pauerstein, *Rabbit endosalpinx inhibits implantation in vitro.* Fertil Steril, 1992. **57**(4): p. 902-7.
98. Heap, R.B., et al., *Hormones, the early embryo and the uterine environment.* J Reprod Fertil, 1979. **55**(1): p. 267-75.
99. Douglas, C.P., *Tubal Ectopic Pregnancy.* Br Med J, 1963. **2**(5361): p. 838-41.
100. Bouyer, J., et al., *Sites of ectopic pregnancy: a 10 year population-based study of 1800 cases.* Hum Reprod, 2002. **17**(12): p. 3224-30.
101. Nicosia, S.V., *Pathology of the oviducts and embryonal remnants.* Obstet Gynecol Annu, 1985. **14**: p. 382-410.
102. Tay, J.I., J. Moore, and J.J. Walker, *Ectopic pregnancy.* West J Med, 2000. **173**(2): p. 131-4.
103. Pisarska, M.D., S.A. Carson, and J.E. Buster, *Ectopic pregnancy.* Lancet, 1998. **351**(9109): p. 1115-20.
104. Brown, J.K., et al., *Human fallopian tube epithelium constitutively expresses integrin endometrial receptivity markers: no evidence for a tubal implantation window.* Mol Hum Reprod, 2012. **18**(3): p. 111-20.

105. Shaw, J.L. and A.W. Horne, *The paracrinology of tubal ectopic pregnancy*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **358**(2): p. 216-22.
106. Yoshinaga, K., *Uterine receptivity for blastocyst implantation*. Ann N Y Acad Sci, 1988. **541**: p. 424-31.
107. Wang, H. and S.K. Dey, *Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(3): p. 185-99.
108. Zhang, S., et al., *Physiological and molecular determinants of embryo implantation*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(5): p. 939-80.
109. Aplin, J.D., *Adhesion molecules in implantation*. Rev Reprod, 1997. **2**(2): p. 84-93.
110. Zhang, L., et al., *Reconstruction of defects following surgery for hypopharyngeal carcinoma using artificial biological material*. Acta Otolaryngol, 2010. **130**(11): p. 1293-9.
111. Gómez de Ferraris, M.E., et al., *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental : [bases estructurales de la patología, el diagnóstico, la terapéutica y la prevención odontológica]*. 3{u00AA} ed. 2009, Buenos Aires ; Madrid etc: Editorial Médica Panamericana. VIII, 454 p.
112. Pusch, J., et al., *The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine*. Biomaterials, 2011. **32**(30): p. 7469-78.
113. de Vries, R.B., et al., *The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(7): p. 771-8.
114. Olson, J.L., A. Atala, and J.J. Yoo, *Tissue engineering: current strategies and future directions*. Chonnam Med J, 2011. **47**(1): p. 1-13.
115. Lysaght, M.J. and J. Reyes, *The growth of tissue engineering*. Tissue Eng, 2001. **7**(5): p. 485-93.
116. Klein, A.M. and B.D. Simons, *Universal patterns of stem cell fate in cycling adult tissues*. Development, 2011. **138**(15): p. 3103-3111.
117. Simons, B.D. and H. Clevers, *Strategies for Homeostatic Stem Cell Self-Renewal in Adult Tissues*. Cell, 2011. **145**(6): p. 851-862.
118. Kyurkchiev, S., et al., *Stem Cells in the Reproductive System*. American Journal of Reproductive Immunology, 2012. **67**(6): p. 445-462.
119. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
120. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
121. Alaminos, M., et al., *Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis*. J Cell Physiol, 2007. **211**(3): p. 692-8.
122. Fisher, M.B. and R.L. Mauck, *Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation*. Tissue Eng Part B Rev, 2013. **19**(1): p. 1-13.

123. Martin-Piedra, M.A., et al., *Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures*. *Cytotherapy*, 2014. **16**(2): p. 266-77.
124. Martin-Piedra, M.A., et al., *Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering*. *Cytotherapy*, 2013. **15**(4): p. 507-18.
125. Vico, M., et al., *Cell viability evaluation of transdifferentiated endothelial-like cells by quantitative electron-probe X-ray microanalysis for tissue engineering*. *Histol Histopathol*, 2015. **30**(11): p. 1333-40.
126. Garzon, I., et al., *Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012. **18**(6): p. 408-19.
127. Carriel, V., et al., *Tissue engineering of the peripheral nervous system*. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2014. **14**(3): p. 301-318.
128. Carriel, V., et al., *Histological and immunohistochemical study of an unusual type of gallbladder duplication*. *Histol Histopathol*, 2014. **29**(7): p. 957-64.
129. Philips, C., et al., *Qualitative and Quantitative Evaluation of a Novel Detergent-Based Method for Decellularization of Peripheral Nerves*. *Ann Biomed Eng*, 2018.
130. Badylak, S.F., *Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response*. *Ann Biomed Eng*, 2014. **42**(7): p. 1517-27.
131. Evans, P.J., R. Midha, and S.E. Mackinnon, *The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology*. *Prog Neurobiol*, 1994. **43**(3): p. 187-233.
132. Wang, Q., et al., *The preparation and comparison of decellularized nerve scaffold of tissue engineering*. *J Biomed Mater Res A*, 2014. **102**(12): p. 4301-8.
133. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. *Biomaterials*, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
134. Roosens, A., et al., *Impact of Detergent-Based Decellularization Methods on Porcine Tissues for Heart Valve Engineering*. *Ann Biomed Eng*, 2016. **44**(9): p. 2827-39.
135. Meng, F., et al., *Whole liver engineering: A promising approach to develop functional liver surrogates*. *Liver Int*, 2017. **37**(12): p. 1759-1772.
136. Gonzalez-Andrades, M., et al., *Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences*. *Transl Vis Sci Technol*, 2015. **4**(2): p. 13.
137. Oliveira, A.C., et al., *Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e66538.
138. Diaz-Moreno, E., et al., *Evaluation of freeze-drying and cryopreservation protocols for long-term storage of biomaterials based on decellularized intestine*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018. **106**(2): p. 488-500.
139. Philips, C., M. Cornelissen, and V. Carriel, *Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts*. *J Neural Eng*, 2018. **15**(2): p. 021003.
140. Gilpin, A. and Y. Yang, *Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 9831534.

141. Nazari, M., M. Kurdi, and H. Heerklotz, *Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order*. Biophys J, 2012. **102**(3): p. 498-506.
142. Sullivan, D.C., et al., *Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system*. Biomaterials, 2012. **33**(31): p. 7756-64.
143. Mendoza-Novelo, B., et al., *Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content*. Acta Biomater, 2011. **7**(3): p. 1241-8.
144. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
145. Romagnoli, C., F. D'Asta, and M.L. Brandi, *Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2013. **10**(3): p. 155-61.
146. Serrato D, N.R., Aguilera A, , *Ingeneria de tejidos: Una nueva disciplina de la medicina regenerativa*. Investigación y ciencia, 2015. **64**: p. 61-69.
147. Shin, H., S. Jo, and A.G. Mikos, *Biomimetic materials for tissue engineering*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4353-64.
148. Boontheekul, T. and D.J. Mooney, *Protein-based signaling systems in tissue engineering*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(5): p. 559-65.
149. Oppelt, P., et al., *The VCUAM (Vagina Cervix Uterus Adnex-associated Malformation) classification: a new classification for genital malformations*. Fertil Steril, 2005. **84**(5): p. 1493-7.
150. Raya-Rivera, A.M., et al., *Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study*. Lancet, 2014. **384**(9940): p. 329-36.
151. Brucker, S.Y., et al., *Treatment of congenital malformations*. Semin Reprod Med, 2011. **29**(2): p. 101-12.
152. Dorin, R.P., A. Atala, and R.E. Defilippo, *Bioengineering a vaginal replacement using a small biopsy of autologous tissue*. Semin Reprod Med, 2011. **29**(1): p. 38-44.
153. Peng, G., H. Liu, and Y. Fan, *Biomaterial Scaffolds for Reproductive Tissue Engineering*. Ann Biomed Eng, 2017. **45**(7): p. 1592-1607.
154. Folkman, J. and M. Hochberg, *Self-regulation of growth in three dimensions*. J Exp Med, 1973. **138**(4): p. 745-53.
155. Amso, N.N., et al., *A COMPARATIVE MORPHOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL-STUDY OF ENDOMETRIAL GLAND AND FALLOPIAN-TUBE EPITHELIA AT DIFFERENT STAGES OF THE MENSTRUAL-CYCLE AND THE MENOPAUSE*. Human Reproduction, 1994. **9**(12): p. 2234-2241.
156. Indumathi, S., et al., *Prospective biomarkers of stem cells of human endometrium and fallopian tube compared with bone marrow*. Cell and Tissue Research, 2013. **352**(3): p. 537-549.
157. Cervello, I., et al., *Somatic Stem Cells in the Human Endometrium*. Seminars in Reproductive Medicine, 2013. **31**(1): p. 69-76.
158. Kyurkchiev, S., A. Shterev, and R. Dimitrov, *Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua*. Reproductive Biomedicine Online, 2010. **20**(3): p. 305-313.

159. Kato, K., et al., *Characterization of side-population cells in human normal endometrium*. Human Reproduction, 2007. **22**(5): p. 1214-1223.
160. Wang, J.J., et al., *The utility of human fallopian tube mucosa as a novel source of multipotent stem cells for the treatment of autologous reproductive tract injury*. Stem Cell Research & Therapy, 2015. **6**: p. 13.
161. Jazedje, T., et al., *Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures*. Journal of Translational Medicine, 2009. **7**: p. 10.
162. Carriel, V., et al., *Tissue Fixation and Processing for the Histological Identification of Lipids*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2017. **1560**: p. 197-206.
163. Carriel, V., et al., *Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2017. **1560**: p. 207-218.
164. Carriel, V., et al., *Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach (vol 136, pg 709, 2011)*. Histochemistry and Cell Biology, 2016. **146**(1): p. 113-113.
165. Carriel, V., et al., *Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach*. Histochem Cell Biol, 2011. **136**(6): p. 709-17.
166. Carriel, V., et al., *Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration*. Journal of Neural Engineering, 2013. **10**(2): p. 14.
167. Xue, M.L. and C.J. Jackson, *Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring*. Advances in Wound Care, 2015. **4**(3): p. 119-136.
168. Kitaya, K., et al., *Diverse functions of uterine proteoglycans in human reproduction (Review)*. Molecular Medicine Reports, 2012. **5**(6): p. 1375-1381.
169. Carriel, V., et al., *In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2017. **11**(5): p. 1412-1426.
170. Reese, S.P., C.J. Underwood, and J.A. Weiss, *Effects of decorin proteoglycan on fibrillogenesis, ultrastructure, and mechanics of type I collagen gels*. Matrix Biology, 2013. **32**(7-8): p. 414-423.
171. Wight, T.N., *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. Current Opinion in Cell Biology, 2002. **14**(5): p. 617-623.
172. Wu, Y.J., et al., *beta(1)-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(14): p. 12294-12301.
173. Alberts, B., *Biología molecular de la célula : Bruce Alberts*. Sexta edición ed. 2016, Barcelona: Ediciones Omega. xxxiv, 1350 p.
174. Alvarez, K., L. Jordi, and H. Jose Angel, *Hemothorax in vascular Ehlers-Danlos syndrome*. Reumatol Clin, 2017.

175. Hartmann, U. and P. Maurer, *Proteoglycans in the nervous system - the quest for functional roles in vivo*. Matrix Biology, 2001. **20**(1): p. 23-35.
176. Zimmermann, D.R. and M.T. Dours-Zimmermann, *Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge*. Histochemistry and Cell Biology, 2008. **130**(4): p. 635-653.
177. Goh, S.K., et al., *Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering*. Biomaterials, 2013. **34**(28): p. 6760-72.