

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTA' di MEDICINA e CHIRURGIA



DOTTORATO DI RICERCA IN
“RIPRODUZIONE, SVILUPPO E ACCRESCIMENTO DELL’UOMO”
XXIV CICLO

Coordinatore : Prof. Claudio Pignata

TESI DI DOTTORATO

"NUOVE APPLICAZIONI ED EVOLUZIONE DELLA TECNICA
ISTEROSCOPICA "

Tutore

Prof. Costantino Di Carlo

Candidato

Dott. Paolo Cirillo

ANNO ACCADEMICO
2009-2011

INDICE

INTRODUZIONE:

Nuove applicazioni ed evoluzione della tecnica isteroscopica.....	pag 4
Cenni storici sull'isteroscopia: Evoluzione nel tempo della tecnica.....	pag 6
L'isteroscopia ambulatoriale.....	pag 11

Parte1: I Linea di ricerca: Comparazione delle differenti tecniche di esecuzione delle indagini isteroscopiche

Cap.1: Lo studio sperimentale.....	pag 15
Cap.2: Materiali e metodi.....	pag 18
Cap.3: Risultati.....	pag 21

Parte 2: II linea di ricerca: Ruolo delle fibre nervose nella patogenesi del dolore durante isteroscopia ambulatoriale

Cap.1: Fattori limitanti la diffusione dell'isteroscopia ambulatoriale.....	pag 28
Cap.2: Il dolore durante l'isteroscopia ambulatoriale.....	pag 30
Cap.3: Innervazione uterina.....	pag 34
Cap.4: Neurotrasmissione sinaptica.....	pag 37
Cap.5: Obiettivo dello studio.....	pag 39
Cap.6: Nostra esperienza.....	pag 41

ANALISI CRITICA.....	pag 51
Parte3: III linea di ricerca: La vaginoscopia nell'identificazione dell'endometriosi vaginale	
Cap.1: L' endometriosi: etiologia e patogenesi.....	pag 55
Cap.2: Endometriosi vaginale: nostra esperienza.....	pag 63
RISULTATI.....	pag 65
BIBLIOGRAFIA	pag 66

INTRODUZIONE

L'isteroscopia costituisce una formidabile innovazione tecnologica che è stata capace di rinnovare profondamente non solo le tecniche di approccio diagnostico e terapeutico ginecologico, ma anche e soprattutto lo spirito stesso alla base del ragionamento clinico in merito alla sfera genitale femminile.

Infatti, quasi ricalcando le orme di una ricerca scientifica che ha concretizzato nel tempo l'umano desiderio di ingrandire il minuscolo e di rendere visibile l'invisibile, così l'isteroscopia ha rappresentato il segno di una vera e propria "rivoluzione copernicana", capace finalmente di oltrepassare le semplici intuizioni diagnostiche e di raggiungere materialmente con la vista la cavità più misteriosa del corpo umano.

Si può affermare senza tema di smentite che proprio l'isteroscopia configura perciò il più grande passo avanti compiuto dalle scienze ginecologiche dopo l'avvento dell'ecografia, arricchito peraltro da possibilità concomitanti di chirurgia mini-invasiva imprevedibili fino a pochi anni fa, anche in virtù dei vorticosi progressi della tecnologia medica.

Non si può ignorare, peraltro, che fin dalle intenzioni dei primissimi pionieri di questa branca il nobile scopo prefisso era costituito dal miraggio di raggiungere finalmente "de visu" l'interno della cavità uterina, potendone così studiare fisiologia e patologia ben aldilà delle semplici suggestioni cliniche o delle "grigie" immagini ecografiche. Né si può negare che la storia stessa della isteroscopia riveli aspetti di imprevedibile interesse sociale e antropologico, ove si pensi

semplicemente all'intreccio con lo sviluppo delle conoscenze sull'energia elettrica, che a partire dal 1879 cominciò a consentire l'illuminazione sistematica della cavità uterina, e che nei più recenti ultimi lustri ha consentito l'impiego chirurgico prima della corrente monopolare e poi di quella bipolare.

La storia dell'isteroscopia, pertanto, pur traendo le proprie origini dalle iniziali intuizioni di Pantaleoni, scivola delicatamente nella cronaca dei giorni nostri, lasciando prevedere, per di più, ulteriori sviluppi, incentrati sulle caratteristiche fisiche dei materiali oltre che sulle tecniche pratiche dell'esecuzione dell'esame.

Sotto i nostri stessi occhi, infatti, abbiamo assistito in pochissimi anni al passaggio da strumenti di calibro cospicuo ad altri, così minuscoli, da non richiedere né pinzamenti del collo uterino, né dilatazione cervicale, in virtù di sistemi ottici sempre più piccoli e perfezionati; abbiamo altresì superato le problematiche legate all'impiego della anidride carbonica grazie a mezzi di distensione più maneggevoli e fisiologici; abbiamo ottimizzato la visualizzazione trasferendo l'immagine dal singolo oculare maneggiato dall'operatore a monitors di ampia visuale che consentono anche la condivisione delle immagini con paziente, colleghi e discenti; abbiamo ormai quasi completamente superato la necessità dell'anestesia generale, in virtù di quelle tecniche oggi definite di "office-hysteroscopy", che consentono quasi sempre una chirurgia efficace con l'elettricità bipolare a paziente completamente sveglia.

In definitiva, circa 140 anni di ricerche sull'isteroscopia hanno repentinamente prodotto i risultati più mirabili ed entusiasmanti proprio in questi ultimi tempi, di cui siamo testimoni, addirittura suscitando presso alcuni Autori l'impressione che trattasi in realtà di un vero e proprio processo di "democratizzazione" della medicina, nel senso di aver reso possibile la fruizione di tale metodica in pratica

non solo a tutte le donne (dalle vergini alle climateriche, passando attraverso i vari quadri della fisiopatologia vulvo-vagino-cervico-uterina), ma anche agli studenti e ai collaboratori presenti al momento della prestazione.

Evoluzione nel tempo della strumentazione isteroscopica

CENNI STORICI SULL'ISTEROSCOPIA

La storia dell'endoscopia, cioè della visualizzazione delle cavità del corpo inizia nel IV secolo a.c. col "*katopter*" (Fig. 1), lo strumento ideato da Ippocrate di Kos per approfondire la visione della cavità rettale. Già nell'antica Roma venivano utilizzati gli "specula" che permettevano di ispezionare la cervice uterina, le cavità nasali ed il retto. Il primo autore che menziona lo speculum è Sorano, il più famoso ginecologo dell'antichità, che insieme a Rufo nel I secolo d.C. studiò presso la scuola medica di Alessandria in Egitto per poi trasferirsi a Roma durante i regni di Adriano e Traiano.

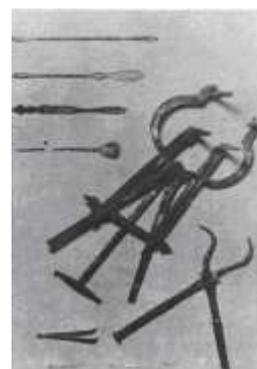


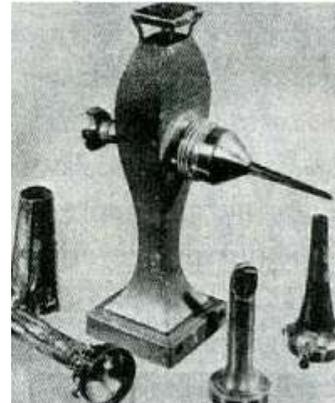
Fig. 1. Il Katopter.

Il medico siriano Archigenes di Apameia, nel I secolo d.C. a Roma, scrive sulle possibili cause e trattamenti del sanguinamento uterino e fa menzione dei "*dioptra*" per l'ispezione uterina. L'arabo Abul Qasim Kalaf Ibn Al Zahrawi da Cordova utilizza per primo la luce riflessa di uno specchio posto davanti ai genitali della donna per illuminare vagina e collo dell'utero, ma è Leonardo da Vinci, agli inizi del '500, che per primo descrive l'utero nella sua reale

morfologia dato che fino ad allora si riteneva fosse bicerne, come per molti animali.

Colui che può considerarsi il padre dell'endoscopia è il tedesco Filippo Bozzini che nei primi anni del diciannovesimo secolo inventa il "*lichtleiter*" (Fig. 2), uno strumento tubulare attraverso il quale si potevano osservare le naturali cavità del corpo umano, come le narici, l'uretra, la vagina, e il retto. La fonte di illuminazione era costituita, a quei tempi, dalla luce di una candela riflessa da uno specchio concavo.

Fig. 2. Il *Lichtleiter*.



Il primo soddisfacente endoscopio fu presentato a Parigi alla Imperial Academy of Medicine nel 1853 dall'urologo Desormeaux

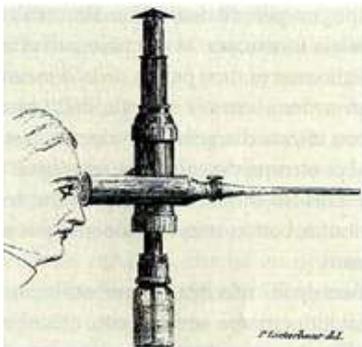


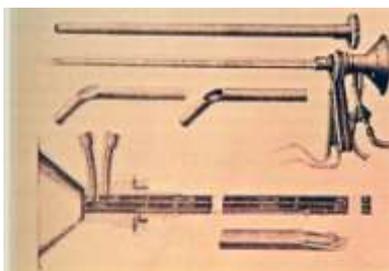
Fig. 3.

L'endoscopio di Desormeaux.

dello strumento. Fu utilizzato esclusivamente per la visione dell'uretra e della vescica e soltanto piú tardi si ipotizzò il suo uso per l'esplorazione della cavità uterina.

Ma la prima isteroscopia di cui si ha notizia è del 1869 ad opera dell'italiano Diomede C. Pantaleoni che utilizza il cistoscopio di Desormeaux ed una spugna per dilatare il canale cervicale, probabilmente una laminaria, che lasciava in situ per 24 ore prima di effettuare l'esame endoscopico. Egli esaminò una donna di 60 anni con un polipo endometriale e fu in grado di distruggere il polipo, risolvendo

alla donna il problema di sanguinamento postmenopausale. A quei tempi, le limitazioni legate alla tecnica, però, non consentirono all'indagine endoscopica della cavità uterina di consolidarsi come metodica diagnostica affermata. Fu solo nel 1879 che Maximilian Nitze, considerato il padre della moderna endoscopia, pubblicò un articolo sul "Wiener Medizinische Presse" in cui descrisse un nuovo strumento, inizialmente utilizzato solo come cistoscopio ed uretroscopio (Fig. 4). Esso consisteva di un'ansa di platino, alimentata dalla corrente elettrica per l'illuminazione distale, di un'ottica costruita all'interno dello strumento stesso e di un sistema di raffreddamento ad acqua.



Sfortunatamente la nuova strumentazione portò alla rapida e universale diffusione soltanto della cistoscopia, ma non fu utilizzata per

Fig. 4. L'endoscopio di Nitze.
l'isteroscopia a causa della differente anatomia dell' utero, che rendeva difficoltosa la

mobilizzazione dello strumento stesso all'interno del canale cervicale e la sua progressione verso la cavità. Il passo successivo fu la realizzazione, da parte di Clado nel 1876, di un isteroscopio dotato di mandrino con ampio diametro, che ben si adattasse all'anatomia del canale cervicale, usato però esclusivamente nel post partum. Nel 1893 Blondel ebbe l'idea di usare due tubi di cui quello esterno serviva per separare le pareti dell'utero e per permettere al tubo più interno di avere una visione chiara non alterata dal sangue o dal muco. Nello stesso anno Morris progettò uno strumento di 9 mm di diametro lungo 22 cm, cavo con un otturatore: una volta inserito in cavità si estraeva l'otturatore permettendo alla luce convogliata da uno specchio di passarci attraverso; in tal modo l'autore descrisse l'endometrio e gli osti tubarici.

Sulla scia di Nitze, Charles David, nel 1907, realizzò la prima isteroscopia di contatto, senza mezzo di distensione. Ma, essendo l'utero una cavità virtuale, si manifestò presto la necessità della distensione meccanica della stessa per favorirne lo scollamento delle pareti ed ottenerne una visione panoramica soddisfacente.

Nel 1959 Harold H. Hopkins, collaborando con il costruttore di endoscopi Karl Storz (Fig. 5), sviluppa un sistema di lenti ("rod lens") caratterizzato da lenti separate da colonne d'aria consentendo di avere una



Fig.5. Karl Storz 1911-1966.

visione nitida e luminosa che aprirà la strada dell'endoscopia moderna (Baggish, 2008). Nel 1962 Silander utilizza il palloncino di Norment ma lo riempie di



Fig.6. Il dispositivo di Linndemann.

acqua permettendo trattamenti con il Radio intracavitario. Nel 1970 K. Edsstrom e F. Fernstrom propongono l'uso di una soluzione di Destrano al 35 % (Hyskon) per distendere la cavità uterina. Aggiungono inoltre due canali uno per l'immissione di liquido e l'altro per l'introduzione di una pinza da biopsia ed utilizzano il blocco paracervicale. Nel 1971, in Germania, Hans Joachim Linndemann propone la CO₂ come il miglior mezzo di distensione per l'isteroscopia diagnostica, affermando come l'utilizzo di un flusso di 80-100 ml/min ed una pressione di insufflazione non superiore a 200 mmHg siano valori esenti da rischi. Ciò apre la strada al controllo dell'insufflazione del gas attraverso appositi insufflatori per la cavità uterina: gli isteroinsufflatori con settaggio di flusso e pressione. Inoltre lo stesso autore per evitare la dispersione di

gas progetta uno speciale adattatore per la portio con un sistema di cappuccio sottovuoto (Fig. 6).

Alla fine degli anni '70 Parent riprende l'isteroscopia a contatto utilizzando isteroscopi con differente diametro di 4, 6 e 8 mm.



Fig. 7. L'isteroscopia di Hamou.

In Europa Jacques E. Hamou introduce nel 1979 notevoli miglioramenti sia nel sistema ottico che in quello di distensione della cavità e nel diametro dello strumento. L'isteroscopia di Hamou (Fig. 7-



Fig.8. L'isteroscopia di Hamou.

8), di produzione Storz, lungo 25 cm, è dotato di un'ottica di 4 mm di diametro ed una visione forobliqua di 30°. L'autore grazie agli ingrandimenti che lo strumento gli consente (1X, 20X, 60X, 150X) riprende la visione a contatto che definisce "Microisteroscopia" (Hamou, 1984). Inoltre l'introduzione delle ottiche Hopkins e la sorgente di luce di 150 watt trasmessa da fibre ottiche contenute in un cavo separato dallo strumento consentono di non sacrificare la qualità dell'immagine. Come mezzo di distensione Hamou utilizza la CO₂.

Negli anni successivi, diversi sono stati i mezzi di distensione utilizzati, sia liquidi che gassosi. Si è passati dall'uso di soluzioni di destrano al 32% o destrosio al 5%, al sorbitolo-mannitolo, dalla CO₂ alla attuale soluzione fisiologica di NaCl 0,9%.

Durante gli anni '80, non si è registrato alcun miglioramento tecnologico di rilievo nel campo dell'isteroscopia, la quale continuava ad essere eseguita con la cosiddetta "tecnica tradizionale".

Speculum e tenaculum erano vengono adoperati per la visualizzazione e prensione della cervice, l'anidride carbonica costituiva il mezzo di distensione più

diffuso e, a causa del notevole diametro degli isteroscopi, molto spesso si rendeva necessaria la dilatazione cervicale e l'anestesia locale o generale in regime di ricovero (*isteroscopia day-case o in-patient hysteroscopy*).

Al contrario, all'inizio degli anni '90, numerosi sviluppi tecnici e strumentali, hanno reso l'isteroscopia meno invasiva e dolorosa e ne hanno incrementato la sua diffusione, riducendo il numero di procedure eseguite in sala operatoria e aumentando quelle praticate in regime ambulatoriale (*office hysteroscopy*).

L'ISTEROSCOPIA AMBULATORIALE

La vera rivoluzione in isteroscopia avviene negli anni '90 con la miniaturizzazione degli strumenti, l'utilizzo di soluzioni saline come mezzo di distensione della cavità uterina e l'introduzione di un approccio atraumatico per l'ingresso dell'isteroscopio nell'orifizio uterino esterno (approccio vaginoscopico o "*no touch technique*"): si configura così la nascita dell'isteroscopia ambulatoriale ("*office hysteroscopy*").

L'isteroscopia ambulatoriale sin dalle sue origini ha dimostrato di avere indiscutibili vantaggi rispetto all'isteroscopia in narcosi (*in-patient hysteroscopy*), in termini di assenza di rischi anestesiológicos, riduzione del tempo e dei costi, di efficacia e di preferenza da parte delle pazienti per la più rapida ripresa delle attività quotidiane e lavorative (Kremer, 2000).

Inoltre, l'*office hysteroscopy*, allo stesso modo dell'*in-patient hysteroscopy*, consente la visualizzazione della cavità uterina e la possibilità di effettuare una biopsia mirata, senza la necessità di dilatazione e curettage, con un risultato

diagnostico più preciso e scevro da complicanze post-operatorie successive alla dilatazione del collo uterino con ferri di Hegar (Towbin, 1996; Goldfarb, 1989).

Attualmente, l'isteroscopia ambulatoriale è riconosciuta come il gold standard per la valutazione della cavità uterina, per indagare il sanguinamento uterino anomalo e per ottenere campioni endometriali ai fini dell'esame istologico.

Ma la vera e propria rivoluzione degli anni '90 in ambito isteroscopico è rappresentata dal passaggio da una isteroscopia ambulatoriale puramente diagnostica ad una isteroscopia anche operativa. Infatti fino all'inizio degli anni '90 il resettore rappresentava l'unica possibilità di trattare isteroscopicamente le patologie uterine. Tuttavia l'utilizzo del resettore, strumento del diametro di circa 1 cm, richiedeva invariabilmente la dilatazione cervicale, l'anestesia locale e/o generale e l'utilizzo della sala operatoria, anche in presenza di piccole patologie uterine.

Nasce così il moderno isteroscopio operativo

"office", ad opera di Stefano Bettocchi, allievo

di Bruno Van Herendel, che si basava sul "chorionscope" a camicia singola con un'ottica di 2,9 mm utilizzato per il prelievo dei villi coriali e per il cateterismo tubarico nelle "Gamete IntraFallopian Transfer" (GIFT) isteroscopiche. Bettocchi modifica tale corionscopio, ideando un isteroscopio a doppia camicia ed a flusso continuo di diametro complessivo di 5mm e ne ovalizza la sezione ("Office Continuous Flow Operative Hysteroscope". Karl Storz Endoscopy, Tuttlingen, Germany). Recentemente è stata poi realizzata una versione più sottile con un'ottica di 2 mm che riduce il diametro finale dell'isteroscopio a 4 mm. Entrambi gli isteroscopi (Fig. 9) sono dotati di due camicie: una per l'irrigazione ed una per l'aspirazione che realizzano un sistema a flusso continuo che

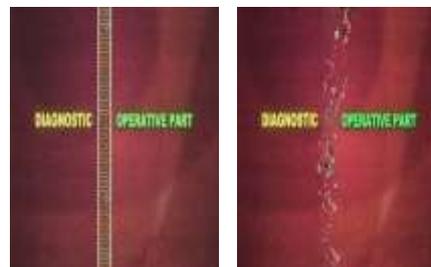


Fig. 9. Isteroscopio operativo "office" 4mm e 5mm.

consentono oltre alla distensione della cavità uterina anche un continuo lavaggio della stessa; il canale operativo di 5 Fr (circa 1.6 mm) consente l'introduzione di strumenti semirigidi meccanici quali microforbici e micropinze o di strumenti elettrificati, mentre il profilo ovalare, che meglio si adatta all'anatomia dell'orifizio uterino interno (OUI), consente un inserimento atraumatico dell'isteroscopio all'interno della cervice. Difatti l'OUI é normalmente ovale con un maggior asse trasversale, del diametro approssimativo di 4-5 mm; con una semplice rotazione di 90° dello strumento si ottiene un allineamento del maggior asse longitudinale dell'isteroscopio con l'asse trasverso dell'OUI, evitando lo stiramento delle fibre nervose e permettendo il superamento di questa fase, la piú critica, con un minimo discomfort da parte della paziente.

Si configura cosí la nascita dell' *"Isteroscopia See & Treat"*, anche detta isteroscopia operativa ambulatoriale, che riduce la distinzione tra fase diagnostica e fase operativa, introducendo il concetto di una singola procedura in cui la parte operativa é perfettamente integrata nel work-up diagnostico (Fig. 10).

Fig. 10. See & Treat Hysteroscopy.



L'innovazione tecnologica che maggiormente contribuisce allo sviluppo e alla diffusione di una simile filosofia é proprio l'ideazione di isteroscopi di piccolo diametro, a flusso continuo, dotati di un canale operativo che rende possibile l'inserimento di strumenti meccanici.

Recentemente il miglioramento della tecnologia a fibre ottiche ha reso possibile la realizzazione di un rivoluzionario ministeroscopio semirigido (Versascope, Gynecare; Ethicon Inc., NJ, USA). Esso é costituito da un'ottica di 1.8 mm

Fig. 11. Versascope.



con un angolo di visione di 0° e una singola camicia monuso esterna, dotata di una guaina in plastica che permette l'afflusso della anidride carbonica (CO₂) o di fluidi a bassa viscosità e di un canale per il deflusso nell'ambito di un sistema a flusso continuo utilizzato per la distensione dell'utero. È inoltre presente un canale operativo che consente l'introduzione di strumenti semirigidi 7 Fr (pinze da biopsia o da presa, forbici) o di elettrodi bipolari 5 Fr (Fig.11).



E' datata infine 1997 l'ultima rivoluzione in ambito isteroscopio, con l'introduzione da parte della Gynecare

(Ethicon Inc., NJ, USA), di un sistema elettrochirurgico bipolare estremamente versatile, chiamato Versapoint (Fig.12). Questo evento rappresenta una pietra miliare nella storia dell'isteroscopia operativa ambulatoriale, avendo contribuito allo sviluppo e alla diffusione della filosofia *See & Treat*. Infatti, grazie all'utilizzo di elettrodi bipolari 5 Fr, oggi il numero di patologie trattate ambulatorialmente è aumentato vertiginosamente (Fig. 13), mentre l'uso del resettore e della sala operatoria viene riservato ad un numero estremamente limitato di casi.

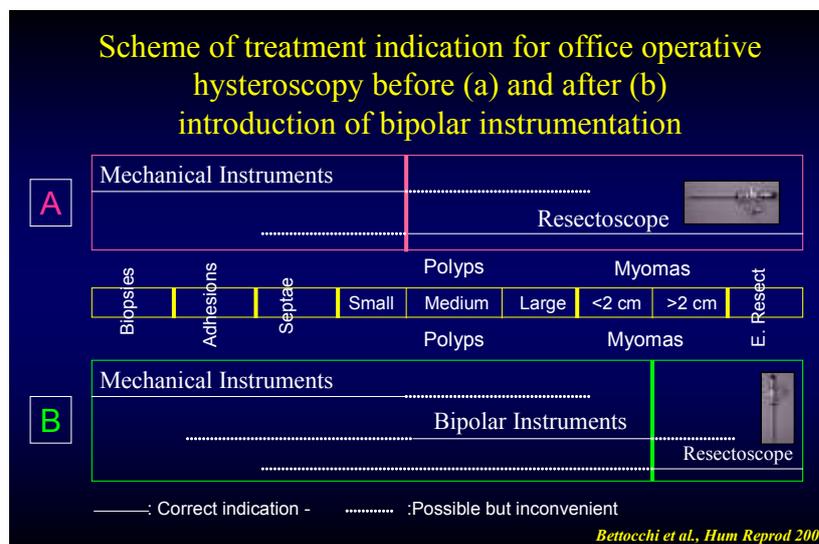


Figura 13. Indicazioni all'isteroscopia operativa ambulatoriale.

Parte 1

I Linea di ricerca: Comparazione delle differenti tecniche di esecuzione delle indagini isteroscopiche

Cap.1

Lo studio sperimentale

Presso il Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della Riproduzione della città di Napoli “Federico II”, è stato eseguito uno studio randomizzato-controllato, al fine di comparare l'isteroscopia con “approccio vaginoscopico” con quella con “approccio tradizionale” (con speculum ed eventuale tenaculum) in termini di score di dolore e tempo di procedura.

300 pazienti sono state randomizzate in due gruppi; Gruppo A: isteroscopia diagnostica con approccio vaginoscopico (150 pazienti) e gruppo B: isteroscopia diagnostica tradizionale (150 pazienti). Tutti gli esami sono stati effettuati attraverso l'utilizzo di un isteroscopio rigido, a flusso continuo, di calibro 5 mm, dotato di una ottica a visione foro-obliqua di 30° (*“Office Continuous Flow Operative Hysteroscope”*. Karl Storz Endoscopy, Tuttlingen, Germany).

. Le pazienti di ogni gruppo sono state ulteriormente suddivise in tre sottogruppi in base al loro stato riproduttivo: nullipare fertili, multipare fertili e donne in

postmenopausa. Alle donne è stato chiesto di quantificare il loro grado di dolore durante le 4 fasi dell'esame: (Fase I) introduzione dell'isteroscopio (Gruppo A) o speculum (Gruppo B) in vagina, (Fase II) progressione dello strumento attraverso il canale cervicale fino all'orifizio uterino interno (OUI), (Fase III) ispezione della cavità uterina, (Fase IV) esecuzione di una biopsia endometriale. Uno score di dolore totale è stato calcolato per ogni gruppo. Per ogni paziente, la durata dell'esame è stata calcolata dalla introduzione alla estrazione dell'endoscopio (Gruppo A) ovvero dello speculum (Gruppo B). Sebbene lo score totale medio di dolore sia stato di 2 in ogni gruppo, l'intervallo di confidenza del 95% per l'isteroscopia vaginoscopica [1.86-2.01] è stato significativamente ($p < 0.05$) più basso che quello per l'isteroscopia tradizionale [2.10-2.26]. Il confronto tra fasi corrispondenti dell'esame ha dimostrato una differenza significativa soltanto nella I fase dello stesso (Gruppo A: 1 [1.0-1.18 95% CI] vs Gruppo B: 2 [2.3-2.8 95% CI]; $p < 0.05$). Non sono, invece state osservate differenze significative tra i due approcci in termini di durata dell'esame.

Il confronto tra i chirurghi che praticano l'isteroscopia vaginoscopica utilizzando la tecnica vaginoscopica e quelli che, invece, adottano la tecnica tradizionale con medesima strumentazione ha dimostrato che i tempi d'esame e lo score di dolore delle pazienti sono stati simili.

Tecnica vaginoscopica:

1. Evita la necessità di introdurre uno speculum e un tenaculum;
2. La vagina viene distesa dalla introduzione di un mezzo di distensione;
3. L'anatomia può poi essere seguita con movimenti gentili dell'isteroscopio in direzione della cervice e del canale cervicale.

Tecnica tradizionale:

1. Uno speculum viene inserito in vagina per visualizzare la cervice
2. Un tenaculum è applicato sul labbro anteriore della cervice uterina per creare una contro-trazione e facilitare l'inserimento dell'ottica.

Cap.2

Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto in accordo alle linee-guida della Dichiarazione di Helsinki (1975). La flow chart delle pazienti è riproposta in figura 1.

Da febbraio 2008 a novembre 2009, a tutte le pazienti afferite alla Unità di Isteroscopia del Dipartimento di Ostetricia è stato chiesto di partecipare ad uno studio su due differenti approcci di isteroscopia diagnostica. 385 pazienti sono state considerate eleggibili per lo studio. 322 hanno accettato di partecipare, (22 di queste hanno rifiutato il processo di randomizzazione), lasciando quindi una popolazione di 300 pazienti che sono state incluse in questo trial randomizzato. (Figura 1).

Prima di accedere allo studio, la finalità dello studio è stata spiegata chiaramente alle donne che frequentavano la nostra Unità di Isteroscopia e un modulo di consenso informato esplicativo è stato firmato da tutti i soggetti arruolati.

Le indicazioni per l'isteroscopia includevano il sanguinamento uterino anomalo, l'aumento dello spessore endometriale all'ecografia, il sospetto di polipo endometriale, mioma o carcinoma, polipo endocervicale e aborti spontanei ripetuti o l'infertilità inspiegata. Le controindicazioni erano: la presenza di un'infezione del tratto genitale, il cancro della cervice, l'abbondante sanguinamento in atto, malattie dell'apparato cardiovascolare di grado severo e la gravidanza sospetta.

Il primo evento stimato è stato il dolore avvertito durante la procedura.

Tutte le pazienti sono state randomizzate in maniera prospettica e divise in due gruppi di 150 pazienti l'uno. La randomizzazione e il reclutamento allo studio sono stati svolti indipendentemente dall'esame clinico, che è stato effettuato solo dopo quello isteroscopico. Le pazienti del gruppo A sono state sottoposte ad

isteroscopia vaginoscopica, mentre le pazienti del gruppo B ad isteroscopia tradizionale.

Le pazienti di ogni gruppo sono state divise in 3 sottogruppi sulla base del loro stato riproduttivo: nullipara fertile (FN), multipara fertile (FM) o postmenopausale (MEN). Le pazienti del gruppo B sono state considerate come gruppo di controllo.

Le donne sono state considerate “fertili” se erano nel periodo di vita compreso tra il menarca e la menopausa.

Tutte le pazienti arruolate sono state sottoposte ad isteroscopia diagnostica, attraverso l'utilizzo di un isteroscopio rigido, a flusso continuo, di calibro 5 mm, dotato di una ottica a visione foro-obliqua di 30° (*“Office Continuous Flow Operative Hysteroscope”*. Karl Storz Endoscopy, Tuttlingen, Germany).

Non è stata impiegata alcuna premedicazione farmacologica, né anestesia locale.

La distensione della cavità uterina è stata ottenuta mediante soluzione salina, erogata automaticamente da una pompa elettronica di irrigazione/aspirazione (Endomat; Karl Storz, GmbH & Co), in modo tale da mantenere una pressione endocavitaria ≤ 50 mmHg ed un flusso intrauterino ≤ 300 mL/min; la pressione di aspirazione è stata regolata a valori ≤ 0.2 bar. L'illuminazione è stata fornita da una fonte luminosa allo Xenon da 300 W. Le immagini sono state visualizzate su un monitor a colori ad alta risoluzione, utilizzando una telecamera a circuito integrato e tutte le procedure sono state videoregistrate dall'introduzione dell'isteroscopio fino alla sua estrazione.

Nessuna preparazione farmacologia o anestesia locale è stata somministrata prima dell'esame. Le donne in cui l'approccio vaginoscopico ha fallito sono state

sottoposte ad isteroscopia tradizionale. Viceversa quelle in cui ha fallito l'approccio tradizionale sono state sottoposte ad isteroscopia con approccio vaginoscopico. Le donne per le quali nessuno dei due approcci si è dimostrato efficace sono state programmate per un'isteroscopia sotto anestesia generale. La superficie endometriale è stata sistematicamente ispezionata e sono stati individuati gli osti tubarici. L'isteroscopia è stato poi retratto in direzione dell'orifizio uterino interno per ottenere una visione panoramica dell'intera cavità. Quando indicato, sono state eseguite 2 o 3 biopsie per ogni paziente. Durante la retrazione dell'isteroscopia è stato ispezionato anche il canale endocervicale sotto visione diretta. Il tempo operativo è stato calcolato dalla introduzione alla estrazione dell'endoscopio (gruppo A) o dello speculum (gruppo B).

Alle donne è stata domandata una stima del loro grado di dolore durante le quattro fasi dell'esame: Fase I: introduzione dell'isteroscopia (gruppo A) o speculum (gruppo B) in vagina, Fase II: progressione attraverso il canale cervicale al di sopra dell'orifizio uterino interno (IUO), Fase III: ispezione della cavità uterina, Fase IV: esecuzione della biopsia endometriale. Un secondo operatore, vicino alla paziente, interrogava la paziente durante la procedura.

Durante le differenti fasi dell'isteroscopia, alle pazienti è stato chiesto di registrare il loro grado di dolore per mezzo di una scala visiva analogica (VAS). In particolare, la sensazione di dolore è stata segnata su una scala da 1 a 5 indicando: 1= no dolore; 2=dolore lieve; 3= dolore tollerabile; 4= dolore severo; 5= dolore intollerabile (Guida et al., 2003).

Uno score totale di dolore è stato calcolato considerando tutti i valori individuali in tutte le fasi dell'esame per ogni gruppo.

L'analisi statistica è stata eseguita usando il test SPSS 9.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Il test di Shapiro-Wilks è stato effettuato per valutare la distribuzione dei dati di tutte le variabili. Età, peso, parità, dimensioni dell'utero e il tempo di procedura hanno dimostrato una distribuzione normale e le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante il two-tailed t di Student test per i dati indipendenti. Le differenze nello score del dolore tra i due gruppi sono state calcolate con il Mann-Whitney U-test. La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

Cap.3

Risultati

Non sono state osservate differenze significative tra i gruppi A e B per quanto riguarda l'età, il peso, le dimensioni dell'utero e la parità. La assegnazione e la randomizzazione sono mostrate in Fig.1.

Non sono stati registrati eventi avversi di rilievo nel corso delle isteroscopie eseguite.

L'isteroscopia non è riuscita in 5 pazienti e un altro gruppo di 5 pazienti ha dovuto sottoporsi ad una isteroscopia alternativa a quella che era stata loro assegnata. Queste 10 pazienti sono state escluse dalla analisi statistica. Per ulteriori dettagli si consulti la Figura 1.

Sono state eseguite biopsie mirate in 14 pazienti FN-A, in 38 FM-A, in 41 MEN-A, e poi in 12 pazienti FN-B, in 42 FM-B e in 39 MEN-B.

I dati sullo score di dolore sono esposti in dettaglio in Figura II. Una prima analisi ha mostrato che lo score medio di dolore nel gruppo A è

compreso tra 1 e 2 mentre nel gruppo B compreso tra 2 e 3 quindi il risultato è significativamente ($p<0.05$) più basso di quello dell'isteroscopia tradizionale [2.10-3.26]. Un'analisi secondaria inerente le singole fasi ha mostrato uno score di dolore significativamente più alto durante la fase I nel Gruppo B rispetto al Gruppo A (2 [2,3-2,8 95% CI] vs 1[1,0-1,18 95% CI], $p< 0,05$), mentre non sono state trovate differenze significative durante le fasi II, III (score medio di dolore 2 in tutte le fasi in entrambi i gruppi).Mentre statisticamente significativa risulta la differenza nella fase IV.

Nell'analisi dei sottogruppi abbiamo osservato una tendenza ad avere un valore di score di dolore più basso durante la fase I nelle pazienti fertili nullipare (1 [0,9-1,2 95% CI] vs 2 [1,7-2,9 95% CI]) e nelle donne in postmenopausa (1 [1,1-1,4 95% CI] vs 3 [2,1-2,6 95% CI]) che sono state sottoposte ad isteroscopia vaginoscopica.

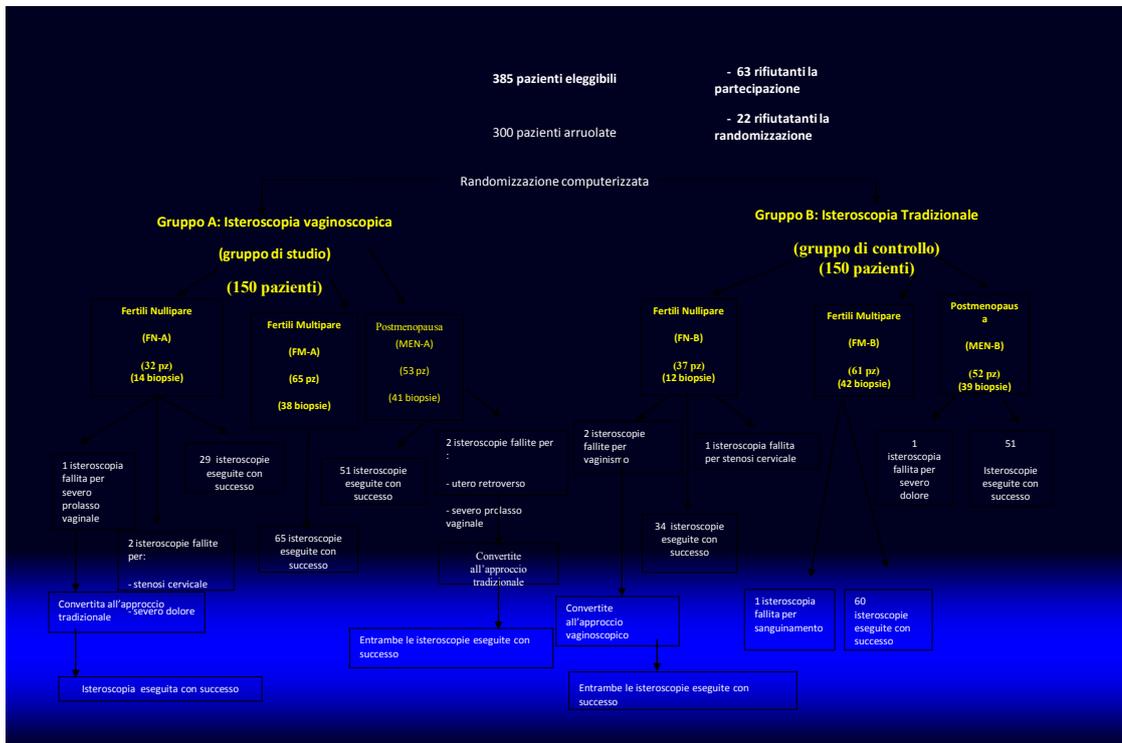
I tempi richiesti per le procedure sono riportati in tabella II. Per quanto riguarda l'approccio isteroscopico, la durata della procedura è stata significativamente più alta ($p<0.001$) in tutte le pazienti che siano state sottoposte a biopsia endometriale. Ad ogni modo, non sono state rilevate differenze statisticamente significative nei tempi dell'esame tra i gruppi A e B indipendentemente dal fatto che siano state effettuate o meno le biopsie.

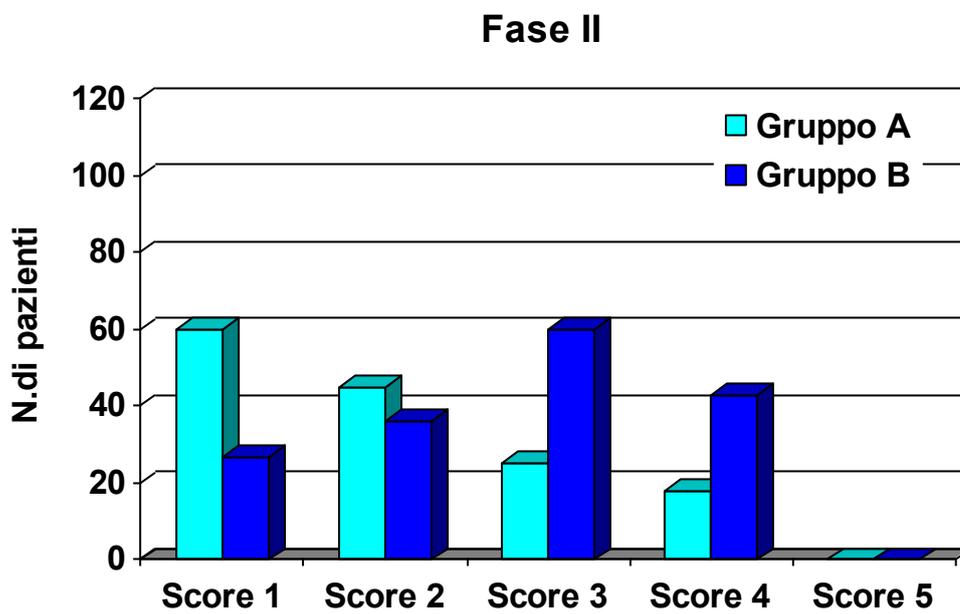
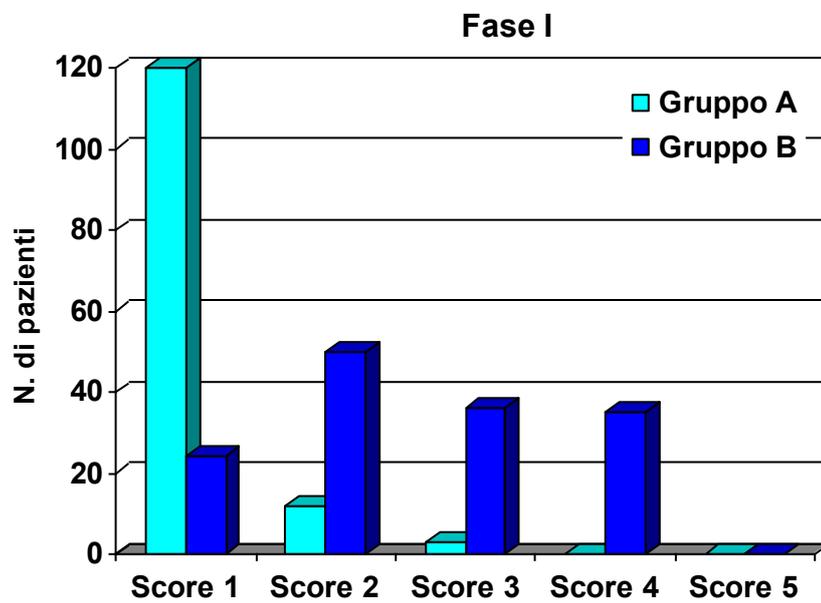
Nell'analisi dei sottogruppi, abbiamo osservato una tendenza alla riduzione del tempo di durata dell'esame nelle nullipare fertili e nelle donne in postmenopausa sottoposte all'approccio vaginoscopico e nelle multipare fertili sottoposte all'approccio tradizionale.

Tabella I: Caratteristiche delle pazienti; tutti i valori misurati \pm la DS.

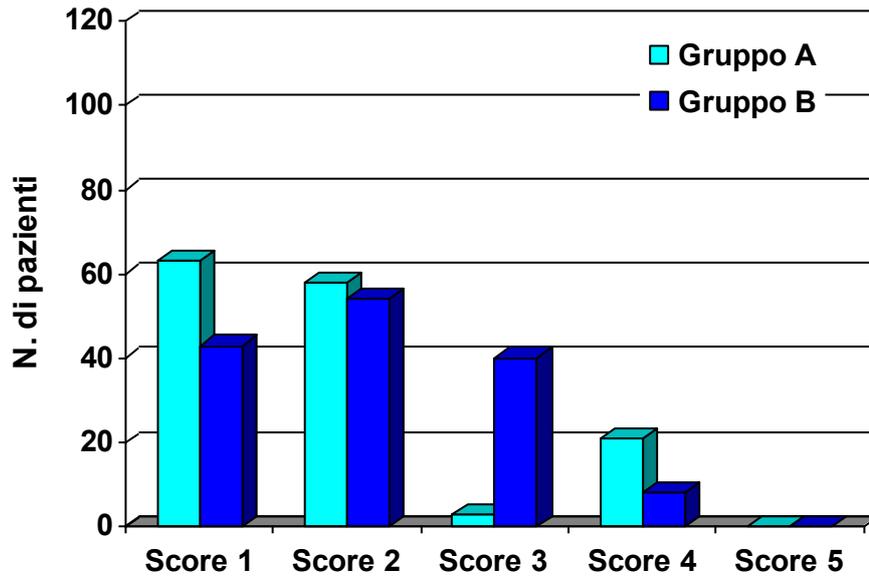
Caratteristiche	Gruppo A (vaginoscopia)	Gruppo B (tradizionale)	Significatività
Età (anni)	43 \pm 14.6	40 \pm 15.6	NS
Peso (Kg)	69.7 \pm 14.8	72.2 \pm 13.7	NS
Dimensioni uterine (isterometria) (cm)	7.6 \pm 2.1	7.9 \pm 3.4	NS
Parità	1.5 \pm 0.7	1.3 \pm 0.8	NS

NS: Non significativo

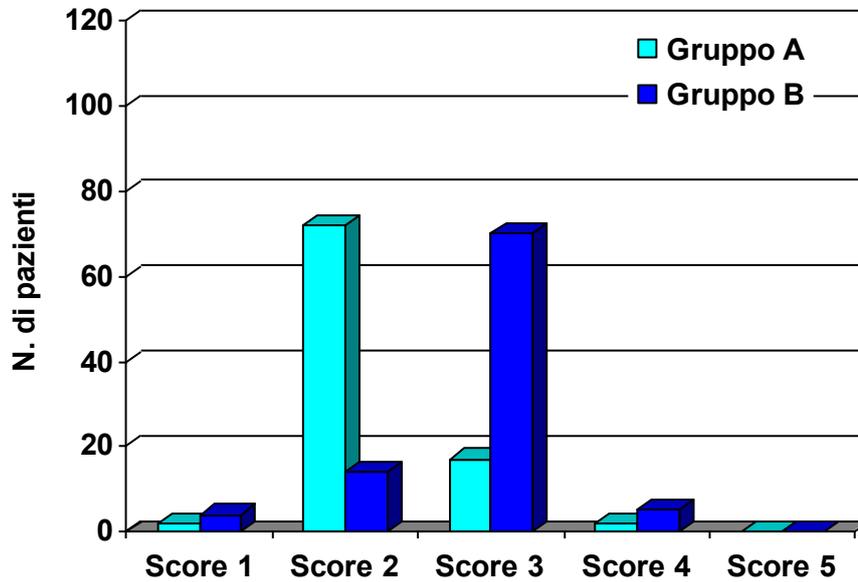




Fase III



Fase IV



Legenda delle figure

Figura I: Arruolamento e Randomizzazione delle pazienti

Figura II: Distribuzione dello score di dolore nei Gruppi A e B; Gruppo A: approccio veginoscopico. Gruppo B: approccio tradizionale. Fase I: introduzione dell'isteroscopio (Group A) o speculum (Group B) in vagina; Fase II: progressione attraverso il canale cervicale fino all'orifizio uterino interno; Fase III: ispezione della cavità uterina; Fase IV: effettuazione di biopsia endometriale. La sensazione di dolore è stata segnata su una scala analogica con range da 1 a 5 indicando: 1= no dolore; 2=dolore lieve; 3= dolore tollerabile; 4= dolore severo; 5= dolore intollerabile.

Parte 2

Il linea di ricerca:

Ruolo delle fibre nervose nella patogenesi del dolore durante isteroscopia ambulatoriale.

Cap.1

Fattori limitanti la diffusione dell'isteroscopia ambulatoriale

Sebbene sia ben acclarato che l'isteroscopia ambulatoriale, con un tasso di successo quasi pari al 100%, rappresenti il gold standard per la valutazione della cavità uterina, la percentuale di ginecologi che esegue tale procedura continua ad essere limitata. Tale già esigua percentuale si riduce ulteriormente quando si prende in considerazione il numero di ginecologi che preferisce rimuovere lesioni benigne in ambito ambulatoriale piuttosto che in sala operatoria.

Diverse sono le ragioni che motivano un simile atteggiamento:

1. La convinzione che soltanto un numero limitato di pazienti potrebbe trarre beneficio dalla procedura. Non ci sono ragioni scientifiche a supporto di tale convinzione, dal momento che è stato dimostrato inequivocabilmente, che tutte le pazienti che non possono o non vogliono essere sottoposte ad anestesia generale o locale, come anche quelle pazienti vergini che desiderano preservare l'integrità imenale, possono essere trattate mediante isteroscopia ambulatoriale. Infatti, al giorno d'oggi l'isteroscopia ambulatoriale dovrebbe essere preferita nella maggior parte dei casi in cui si sospetti un'anomalia, maggiore o minore, della cavità uterina (anche in pazienti asintomatiche).

2. La necessità di eseguire due procedure in quelle pazienti che necessitano di un trattamento chirurgico in sala operatoria. La più comune preoccupazione della gran parte dei ginecologi nasce dalla convinzione che la paziente che necessiti di un qualsivoglia trattamento chirurgico, ovvero quella nella quale venga diagnosticata una lesione da trattare, debba sottoporsi a due distinte procedure. Tuttavia, la moderna tecnologia isteroscopica ha reso possibile la diagnosi ed il trattamento della maggior parte delle patologie intrauterine in una unica procedura ambulatoriale.

3. Alto investimento economico iniziale con esiguo rimborso. È innegabile che la strumentazione necessaria per eseguire una isteroscopia ambulatoriale costituisca un investimento importante e che il rimborso dipenda primariamente dall'ubicazione e dal numero di pazienti che si sottopongono a tale indagine. Ad ogni modo, considerando complessivamente tempi e costi, si può affermare che è sicuramente molto più conveniente eseguire una rapida isteroscopia "*see and treat*" in ambito ambulatoriale piuttosto che programmare un intervento in sala operatoria.

4. Il presunto elevato livello di esperienza necessario per eseguire una procedura operativa in ambito ambulatoriale. L'esperienza ha dimostrato che l'isteroscopia operativa ambulatoriale è una tecnica tutt'altro che difficile e che la curva di apprendimento può essere ulteriormente ridotta mediante: un training supervisionato, un'appropriate conoscenza delle tecniche e della strumentazione e, l'utilizzo di mini isteroscopi ad elevato potere risolutivo.

5. Allo stato attuale, la principale limitazione alla diffusione dell'isteroscopia ambulatoriale è la **sensazione di disagio, talora di dolore**, che ha la paziente durante la procedura. L'isteroscopia continua infatti ad essere

percepita dalla maggior parte delle pazienti come una tecnica invasiva e dolorosa; ecco perché molte di esse ancora preferiscono l'approccio in sala operatoria, ritenendolo indolore. Inoltre, sono spesso gli stessi ginecologi responsabili della scarsa diffusione delle procedure ambulatoriali. In primis per il timore di suscitare dolore nelle pazienti e poi per la naturale preoccupazione di non essere in grado di svolgere l'esame in una situazione in cui la paziente è vigile e quindi perfettamente in grado di osservare e giudicare il loro operato.

Cap.2

Il dolore durante l'isteroscopia ambulatoriale

Il dolore durante l'isteroscopia ambulatoriale è dovuto a:

- L'introduzione dell'isteroscopio attraverso il canale cervicale, specialmente quando viene spinto ad attraversare l'orifizio uterino interno e se si è in presenza di stenosi moderate o severe del canale;
- L'attività contrattile del miometrio causata dalla distensione della cavità prodotta dal mezzo di distensione;
- La stimolazione diretta delle pareti uterine che venendo a contatto con lo strumento portano al rilascio di prostaglandine. (Zupi, 1995; Nagele, 1997; Tam, 2001).

Nell'ultimo decennio gli sforzi della ricerca, nel campo dell'isteroscopia, sono stati indirizzati alla massima ottimizzazione della procedura e alla

conseguente minimizzazione del disagio delle pazienti. In particolare, gli elementi che hanno notevolmente contribuito ad aumentare l'accessibilità e l'accettabilità dell'isteroscopia ambulatoriale, rendendola una procedura quasi indolore, veloce e scevra da complicanze, sono l'utilizzo della soluzione salina come mezzo di distensione, la disponibilità di mini isteroscopi rigidi e semi-rigidi ad alta risoluzione e l'introduzione dell'approccio vaginoscopico, ad opera di Bettocchi e Selvaggi (Bettocchi, 1997).

Numerosi studi retrospettivi e randomizzati (Paschopoulos, 1997; Cicinelli 2003; Guida, 2006) hanno dimostrato che l'approccio vaginoscopico è altamente efficace e più veloce dell'approccio tradizionale, rispetto al quale offre anche il vantaggio di una riduzione del disagio della paziente.

La riduzione del dolore è legata essenzialmente alle modifiche introdotte nella prima fase della procedura: mentre infatti la distensione vaginale con mezzo liquido è indolore, l'introduzione dello speculum, finanche del più piccolo, risulta generalmente mal tollerata dalla paziente. Questo elemento acquista particolare rilevanza in considerazione del fatto che le pazienti che si sottopongono all'isteroscopia sono spesso molto ansiose; pertanto, riducendo la sensazione dolorosa durante la prima fase della procedura, è verosimile attendere una migliore performance globale.

Data la ricca innervazione della cervice e dell'utero vari sono stati i metodi testati per ridurre il disagio associato all'isteroscopia, sia mediante anestesia locale che analgesia sistemica.

Broadbent e coll. (1992) hanno proposto l'uso di un'iniezione intracervicale di lignocaina 1% con adrenalina 1:200000 5 minuti prima dell'esecuzione dell'isteroscopia ambulatoriale. L'utilizzo di questa

premedicazione é limitato a particolari casi, data l'alta percentuale di pazienti che hanno trovato l'iniezione intracervicale la parte piú dolorosa dell'intera procedura o dolorosa quanto l'isteroscopia stessa. Il fallimento della tecnica potrebbe essere dovuto al mancato blocco del plesso nervoso ovarico, responsabile dell'innervazione del fondo uterino.

Per ovviare al dolore durante l'isteroscopia ambulatoriale, é stato valutato anche l'utilizzo di spray, creme e gel anestetici ad uso locale; i risultati sono controversi: secondo Davies (1997) l'utilizzo di tali prodotti risulta efficace per ridurre il dolore connesso con l'uso del tenaculum, mentre non vi sono differenze statisticamente significative tra il gruppo di studio e il gruppo placebo per quanto concerne la fase isteroscopica vera e propria; al contrario secondo Soriano (2000) questi presidi si sono dimostrati efficaci nel ridurre il dolore ed il discomfort globale delle pazienti durante l'intera procedura.

Lau e coll. (2000) hanno valutato l'efficacia dell'instillazione di anestetici locali per via intrauterina in uno studio a doppio cieco in cui i casi ricevevano 5 mL di lignocaina al 2%. Sebbene in teoria l'uso di anestetici per via topica avrebbe dovuto ridurre il dolore durante la procedura per effetto di un blocco diretto delle terminazioni nervose dell'endometrio, nella pratica ciò non poteva essere dimostrato.

Giorda e coll. (2000) hanno dimostrato che con un blocco paracervicale (5 minuti prima dell'esecuzione dell'esame con 20 mL di mepivacaina all'1% iniettata con un ago di 21 gauge a ore 3,5,7 e 9 a livello della giunzione cervico-vaginale) e con l'utilizzo di un isteroscopio di 5 mm di diametro le pazienti mostrano una ridotta percezione del dolore; tuttavia il blocco paracervicale non é

scevro da complicazioni, quali il sanguinamento dai fornici vaginali che richiede in taluni casi l'applicazione di uno zaffo vaginale.

Da una recente review di Yang si desume che non vi sono evidenze che suggeriscano un uso routinario di analgesici o di anestesia locale durante l'office hysteroscopy in tutte le pazienti. Pertanto, l'isteroscopia in regime ambulatoriale e senza alcun tipo di premedicazione può dimostrarsi sicura e con un grado di dolore accettabile, purché alla paziente sia spiegata dettagliatamente l'intera procedura e purché sia costantemente coinvolta mediante l'utilizzo di monitors che consentano la distrazione dal dolore e la sua compartecipazione alla procedura. L'uso dell'anestesia locale potrebbe essere riservato alle pazienti inclini a reazioni vaso-vagali. In questi casi selezionati é consigliata l'applicazione topica di lignocaina e l'instillazione di anestetici locali per via intrauterina, in quanto scevre dagli effetti avversi associati ad una anestesia parenterale, al dolore e al sanguinamento nel sito di iniezione e al rischio di intravasazione degli anestetici locali (Yang, 2002).

nota con il nome di *ganglio cervicale di Lee-Franckenhäuser*. Accanto a questo ganglio plessiforme si notano sovente altri due piccoli gangli: uno posto in avanti laddove l'uretere penetra nella vescica, l'altro più posteriore sul lato mediale dell'uretere tra questo e il collo dell'utero. Oltre ai rami provenienti da questi gangli l'utero è anche raggiunto da fibre che spiccandosi dal plesso pelvico puntano verso la vescica in avanti e verso il retto posteriormente. Un ramo particolare proveniente dal ganglio cervicale seguendo l'arteria uterina cammina sul margine laterale dell'utero e attraversato un piccolo ganglio, il ganglio ovarico, manda fibre al fondo dell'utero, alle tube, al legamento largo e al legamento rotondo. Dal ganglio ovarico partono inoltre rami nervosi per l'ovaio (Lambertini, 1968).

Fig.14. Innervazione pelvica

In base alle osservazioni cliniche si ritiene che le fibre sensitive dell'utero, della tuba e dell'ovaio raggiungano il midollo spinale attraverso le radici posteriori del 10°- 12° nervo toracico fino al primo nervo lombare, e del 3°-4° nervo sacrale. Le vie nervose afferenti al midollo spinale passano in parte attraverso i rami del plesso ipogastrico, posti nel tessuto connettivo lasso retroperitoneale a livello del promontorio del sacro. È perciò che la resezione del plesso ipogastrico praticata appunto in corrispondenza del promontorio sacrale è stata proposta per lenire alcune sindromi funzionali utero-ovariche associate a manifestazioni dolorose. Oltre a ciò, a spiegare molti fatti di correlazione funzionale di natura nervosa fra l'utero e altri visceri, vanno tenute presenti anzitutto le connessioni prossimali dirette ed indirette del plesso pelvico in generale con altri plessi simpatici dell'addome, secondariamente il fatto che i plessi nervosi utero-vaginale ed utero-ovarico provvedono in particolare all'innervazione di altri organi del bacino, quali ad esempio, la vescica e l'uretere (Testut, 1977).

Controversa é la distribuzione delle fibre nervose nelle diverse tonache della parete uterina. L'innervazione uterina é principalmente associata alla presenza dei vasi sanguigni, ma molte fibre possono trovarsi libere tra i fasci muscolari e nel tessuto connettivo del miometrio ed in misura minore negli strati endometriali (Haase, 1997). Secondo Zoubina e coll. (1998), l'innervazione é moderata nello strato longitudinale e circolare del miometrio, mentre é abbondante all'interno delle zone vascolari, che si trovano interposte tra questi due strati di muscolatura liscia.

Molti studi hanno riportato un aumento di densità di fibre nervose nel miometrio di donne con dolore pelvico cronico (Atwal, 2005; Quinn, 2004; Quinn, 2002). É stata anche riportata una proliferazione delle ramificazioni delle fibre nervose in aggiunta alla proliferazione delle espansioni perivascolari delle fibre attorno alle arterie e alle vene miometriali in pazienti con endometriosi, dismenorrea e dispareunia. (Quinn, 2004).

Secondo alcuni Autori l'endometrio é privo di terminazioni nervose (Burkitt, 1993), secondo altri l'innervazione é presente, ma significativamente inferiore rispetto all'innervazione dello strato muscolare e, la presenza di suddette fibre puó essere spiegata con la presenza di vasi sanguigni siti al confine miometriale (Haase, 1997; Zoubina, 1998) .

Neurotrasmissione sinaptica

Nel sistema nervoso sono presenti due tipi di elementi cellulari: i neuroni, specializzati per la produzione e conduzione degli impulsi nervosi e le cellule gliali, che svolgono funzioni di sostegno e trofiche (Barboni, 2000).

Dal punto di vista anatomico, funzionale e trofico, i neuroni rappresentano entità cellulari singole. Il soma, o corpo cellulare e i dendriti, ramificazioni a breve decorso che si irradiano dal soma, rappresentano la parte recettiva della cellula nervosa, quella cioè cui pervengono gli impulsi nervosi da altri neuroni. L'assone, prolungamento in genere singolo, ha un decorso più o meno lungo e trasmette gli impulsi nervosi fino alla sua ramificazione terminale. (polarizzazione dinamica dei neuroni) (Barboni, 2000).

Il contatto tra i terminali degli assoni e altri neuroni prende il nome di *sinapsi*. La sinapsi rappresenta il punto di contatto tra due cellule nervose e consente il passaggio dell'impulso nervoso da un neurone detto presinaptico ad un altro neurone che è detto postsinaptico. Dal punto di vista funzionale, la sinapsi è caratterizzata dalla unidirezionalità di trasmissione dell'impulso nervoso

Questa caratteristica dipende dalle modalità con cui si susseguono gli eventi che permettono il passaggio degli impulsi da un neurone all'altro e dalle caratteristiche strutturali delle sinapsi stesse. I terminali degli assoni si dilatano infatti per formare i *bottoni terminali*. Questi contengono numerosi mitocondri e piccole vescicole presinaptiche in cui si trova un *mediatore chimico* o *neurotrasmettitore* che, liberato nello spazio intersinaptico, si lega ai recettori della membrana postsinaptica modificandone le caratteristiche di permeabilità

ionica. Si creano in tal modo le condizioni necessarie al passaggio dell'impulso nervoso.

Un mediatore chimico può essere considerato un neurotrasmettitore, a livello di una determinata sinapsi neuronale, qualora soddisfi i seguenti quattro criteri (Kandel, 1994).

- viene sintetizzata dal neurone.
- è presente nelle terminazioni pre-sinaptiche e viene liberata in quantità sufficiente per esercitare l'azione che le si attribuisce su un neurone post-sinaptico o su un organo effetore.
- quando venga introdotta dall'esterno (come un farmaco), in concentrazioni opportune, è in grado di riprodurre esattamente l'azione del neurotrasmettitore liberato per via endogena.
- esiste un meccanismo specifico per il suo smaltimento dai siti dove esercita la propria attività (la fessura sinaptica).

E' stato possibile caratterizzare un notevole gruppo di cellule nervose per ciò che riguarda le proprietà biochimiche dei loro neurotrasmettitori e ne è emerso un importante criterio di validità generale: *un neurone, allo stato adulto, usa lo stesso tipo di neurotrasmettitore a livello di tutte le sue sinapsi*. Questo tipo di generalizzazione è stato tradotto in un principio di validità generale, nel 1957, da *John Eccles*, sul fondamento dei lavori e delle considerazioni teoriche di *Henry Dale*.

Tuttavia l'interpretazione restrittiva del *principio di Dale* è comunque contraddetta da alcuni neuroni in via di sviluppo che, sintetizzano e liberano più di un neurotrasmettitore. Inoltre, sono stati descritti anche molti neuroni adulti che contengono più di una sostanza potenzialmente capace di fungere da messaggero

chimico. Questa condizione, chiamata generalmente *coesistenza*, comporta in generale la presenza di un neurotrasmettitore a basso peso molecolare accanto ad un polipeptide neuroattivo. E' possibile anche che lo stesso neurone abbia a liberare insieme parecchi peptidi neuroattivi diversi in quanto i peptidi si formano, in generale, da poliproteine precursori di dimensioni elevate. Di conseguenza, volendo mantenere l'importanza del principio di biologia cellulare, formulato da *Dale ed Eccles*, questo principio di specificità neuronale deve essere oggi riformulato per affermare che *un neurone usa la stessa combinazione di messaggeri chimici a livello di tutte le proprie sinapsi.*

Il SN utilizza due grandi classi di sostanze chimiche per inviare i propri messaggi: 1) i *neurotrasmettitori* costituiti da molecole a basso peso molecolare e 2) i *peptidi neuroattivi* costituiti da brevi catene di aminoacidi.

Cap.5

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Il razionale alla base della possibilità di eseguire isteroscopie operative ambulatoriali senza l'uso di analgesia o anestesia risiede nelle caratteristiche anatomiche dell'utero; infatti, l'innervazione sensitiva dell'utero parte dallo strato miometriale, mentre l'endometrio ed il tessuto fibrotico eventualmente presente non sono innervati. Tuttavia la presenza delle fibre nervose a livello endometriale è tutt'ora controversa. Secondo alcuni Autori l'endometrio sarebbe normalmente privo di terminazioni nervose (Burkitt, 1993), mentre secondo studi recentissimi la presenza di fibre nervose sarebbe identificabile solo in donne con patologie

ginecologiche estrogeno-dipendenti, come endometriosi, fibromatosi uterina, adenomiosi (Al-Jefout, 2007; Tokushige, 2006 [A]; Tokushige, 2006 [B]; Wang, 2009).

L'esperienza clinica in ambito isteroscopico ci ha insegnato che la gran parte delle donne che vengono sottoposte ad isteroscopia operativa ambulatoriale avverte soltanto un minimo fastidio/dolore durante le procedure in cui l'endometrio viene sollecitato (es. biopsia endometriale, polipectomia), mentre una quota non trascurabile di pazienti manifesta una intensa iperalgesia ogni qual volta strumenti meccanici e/o elettrodi bipolari stimolano l'endometrio stesso, lasciando intravedere la presenza ed un potenziale ruolo delle fibre nervose sensitive a carico dell'endometrio nella genesi di tale dolore.

L'obiettivo del nostro studio é stato pertanto quello di valutare la presenza di fibre nervose endometriali in pazienti sottoposte ad isteroscopia ambulatoriale e ricercare un loro potenziale ruolo nella patogenesi del dolore durante l'isteroscopia.

Il secondo obiettivo del nostro studio é stato quello di valutare se la presenza di tali fibre nervose oltre ad essere causa di dolore durante l'isteroscopia, potesse essere anche associata alla presenza di patologie ginecologiche estrogeno-dipendenti come endometriosi e fibromiomas uterina, come recentemente ipotizzato in letteratura.

Cap.6

Nostra Esperienza

Sono state arruolate nel presente studio tutte le donne in età fertile, afferenti presso l'unità di Isteroscopia del Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana dell' Università di Napoli "Federico II", da Dicembre 2007 ad Aprile 2009.

I criteri di esclusione sono stati i seguenti: età pre-puberale o post-menopausale, infezioni del tratto genitale, immunodepressione, storia di carcinoma della cervice uterina, severa compromissione cardiovascolare, sospetto di gravidanza.

Ogni paziente arruolata ha sottoscritto un consenso informato per la adesione allo studio.

Interventi

Tutte le pazienti arruolate sono state sottoposte ad isteroscopia diagnostica, attraverso l'utilizzo di un isteroscopio rigido, a flusso continuo, di calibro 5 mm, dotato di una ottica a visione foro-obliqua di 30° (*"Office Continuous Flow Operative Hysteroscope"*. Karl Storz Endoscopy, Tuttlingen, Germany).

Non è stata impiegata alcuna premedicazione farmacologica, né anestesia locale. L'esame è stato eseguito con approccio vaginoscopico, ovvero senza l'impiego di speculum e pinza da collo.

La distensione della cavità uterina è stata ottenuta mediante soluzione salina, erogata automaticamente da una pompa elettronica di irrigazione/aspirazione (Endomat; Karl Storz, GmbH & Co), in modo tale da mantenere una pressione endocavitaria ≤ 50 mmHg ed un flusso intrauterino ≤ 300 mL/min; la pressione di

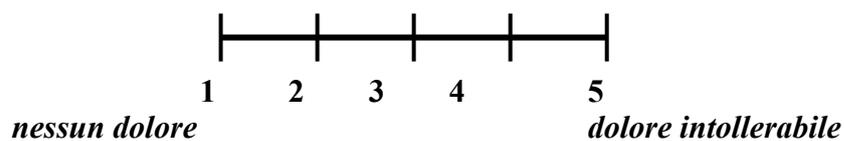
aspirazione é stata regolata a valori ≤ 0.2 bar. L'illuminazione è stata fornita da una fonte luminosa allo Xenon da 300 W. Le immagini sono state visualizzate su un monitor a colori ad alta risoluzione, utilizzando una telecamera a circuito integrato e tutte le procedure sono state videoregistrate dall'introduzione dell'isteroscopia fino alla sua estrazione.

Subito dopo l'ispezione della cavità uterina, sono state effettuate una o più biopsie endometriali con la tecnica definita "grasp biopsy", al fine di prelevare una quantità di endometrio sufficiente per un corretto esame istologico. Le pinze da biopsia sono state posizionate a branche aperte a livello dell'endometrio in modo da penetrare all'interno del tessuto per circa 0.5-1 cm ed evitare di sollecitare e/o ledere il sottostante miometrio.

Durante l'effettuazione dell'esame isteroscopico, a ciascuna paziente è stato chiesto di quantificare il grado di discomfort/dolore durante le 7 fasi della procedura: introduzione dell'isteroscopia in vagina (fase I), progressione attraverso il canale cervicale sino all'orifizio uterino interno (OUI) (fase II), visualizzazione della cavità uterina (fase III), esecuzione della biopsia endometriale (fase IV), esecuzione della eventuale altra biopsia endometriale (fase V), eventuale procedura operativa (fase VI) e 30 minuti dopo il termine dell'isteroscopia stessa (fase VII).

La paziente veniva intervistata durante ciascuna fase isteroscopica sulla presenza e/o l'entità di discomfort o dolore, allo scopo di ottenere una rappresentazione semiquantitativa della sintomatologia dolorosa, assegnando un valore da 1 (nessun dolore) a 5 (dolore intollerabile) su una Scala Analogica Visiva (VAS) di cinque centimetri (Fig. 15).

Fig.15. Visual Analogue Scale (VAS).



1 = nessun dolore;

2 = dolore lieve;

3 = dolore tollerabile;

4 = dolore severo;

5 = dolore intollerabile.

Analisi morfologica: processazione e conservazione dei campioni

Successivamente al prelievo, il tessuto endometriale é stato immediatamente fissato in soluzione di Bouin e poi immerso in paraffina per lo studio immunostochimico. Gli antigeni studiati sono stati S100, NSE, SP, CGRP, VIP, NPY, NKA, NKB, NKR1, NKR2, NKR3 al fine di dimostrare la presenza sia di fibre nervose mieliniche che amieliniche (Polak, 1997).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita usando il software Statistical Package for Social Science SPSS 14.0 for Windows (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). ***Il test del χ^2 è stato utilizzato per valutare la significatività delle variabili categoriche, mentre il Mann-Whitney U test è stato effettuato per la valutazione delle variabili continue.*** In entrambi i test, la significatività statistica è stata definita per valori di p minori di 0.05.

cap.7

RISULTATI

Delle 104 pazienti che soddisfacevano i criteri di inclusione, 99 hanno acconsentito a partecipare allo studio. Le indicazioni all'isteroscopia sono riportate nella Tabella 3.

Tabella 3. Indicazioni all'isteroscopia ambulatoriale.

Ispessimento endometriale	39/99	39.4%
Menometrorragia	19/99	19.2%
Controllo post-chirurgia resettoscopica	11/99	11.1%
Polipo cervicale	8/99	8.1%
Mioma uterino	8/99	8.1%
Infertilità	6/99	6.1%
Controllo post-chirurgia laparoscopica	1/99	1.1%
Setto uterino	1/99	1.1%
Falda liquida endocavitaria all'USG-TV	1/99	1.1%
Adenomiosi	1/99	1.1%
Algie pelviche di ndd	1/99	1.1%
Sospetto colposcopico di patologia cervicale	1/99	1.1%
Iperplasia ghiandolare semplice al precedente istologico	1/99	1.1%
Iperplasia complessa atipica al precedente istologico	1/99	1.1%

L'isteroscopia é stata eseguita con successo in tutte le 99 pazienti. Sulla base del VAS score durante la biopsia endometriale (VAS score fase IV) le 99 pazienti sono state divise in 2 gruppi: Gruppo A: pazienti con VAS score > 2 (28 pazienti) e Gruppo B: pazienti con VAS score ≤ 2 (71 pazienti).

La nostra attenzione si é focalizzata sulla fase della biopsia endometriale, in quanto un eventuale dolore, elicitato dalla pinza da biopsia, dovrebbe teoricamente essere legato alla presenza di fibre nervose nell'endometrio. Le altre fasi non sono state considerate nell'analisi dei risultati in quanto il VAS score risulta essere influenzato da molteplici fattori (es. passaggio dell'isteroscopio attraverso il canale cervicale, sovradistensione della cavità uterina, stimolazione del miometrio).

Le principali caratteristiche delle pazienti sono state riportate in Tabella 4. Nessuna differenza significativa in termini di età, parità e delle principali caratteristiche demografiche era stata riscontrata tra i due gruppi.

Tabella 4. Caratteristiche delle pazienti. I dati sono riportati come media \pm SD.

	Gruppo A	Gruppo B	P value
Etá	38.84 \pm 7.80	40.33 \pm 7.44	ns
Paritá	1.52 \pm 1.16	1.36 \pm 0.83	ns

Nei campioni di tessuto endometriale del Gruppo A é stato riscontrato un incremento statisticamente significativo del contenuto di S100, NSE, VIP, NPY, NKA, NKR1 ($p < 0.05$) rispetto alle donne del Gruppo B (Tab.5).

Tabella 5. Valutazione quantitativa degli studi di immunoistochimica.

	Gruppo A	Gruppo B	P value
S100	0.246	0.090	0.008*
NSE	0.300	0.140	0.010§
SP	0.285	0.131	n.s.
CGRP	0.284	0.148	n.s.
VIP	0.319	0.137	0.004*
NPY	0.298	0.129	0.008*
NKA	0.339	0.136	0.008*
NKB	0.328	0.138	n.s.
NKR1	0.263	0.130	0.044§
NKR2	0.319	0.140	n.s.
NKR3	0.300	0.141	n.s.

* $P < 0.01$ vs Gruppo B; § $P < 0.05$ vs Gruppo B.

I dati sono riportati come mediana.

Nel gruppo A si sono osservati 14 casi di endometriosi/miomatosi uterina su un totale di 28 pazienti (50%), mentre nel gruppo B si sono osservati 18 casi su 71 pazienti (25%) (Fig.16). Tale differenza é risultata statisticamente significativa ($p = 0.018$).

Fig.16. Percentuale di donne affette da fibromatosi uterina/endometriosi nei due Gruppi.

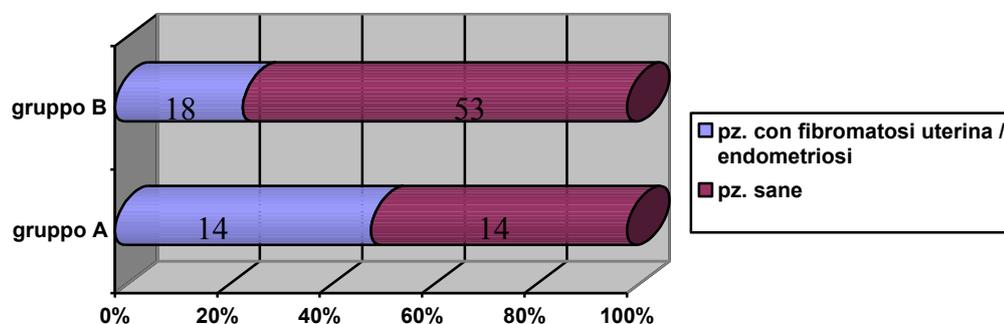
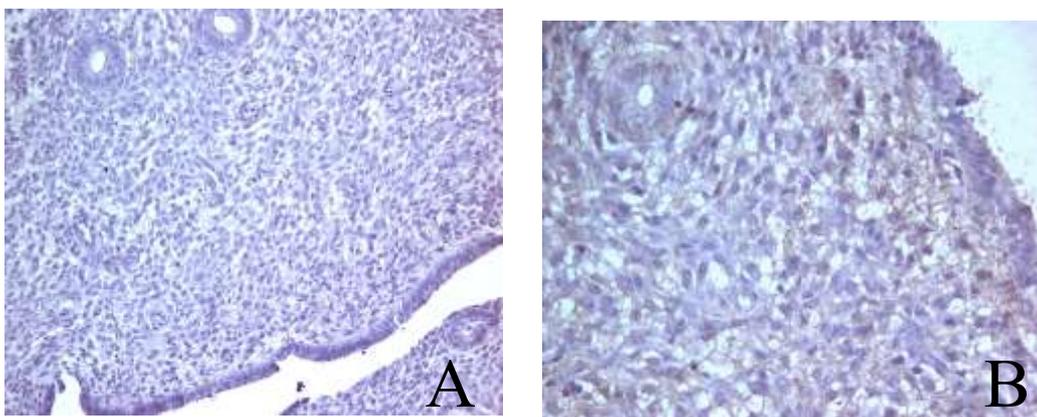


Fig. 17. Analisi immunoistochimica.



A) Assenza di immunopositività dei neuropeptidi e dei recettori per le neurokinine, a livello dello strato funzionale endometriale, in paziente del Gruppo B. Ingrandimento originale 20X.

B) Assenza di immunopositività dei neuropeptidi e dei recettori per le neurokinine, a livello dello strato funzionale endometriale, in paziente del Gruppo B. Ingrandimento originale 40X.

Fig. 18. *Analisi immunoistochimica in pazienti del Gruppo A.*

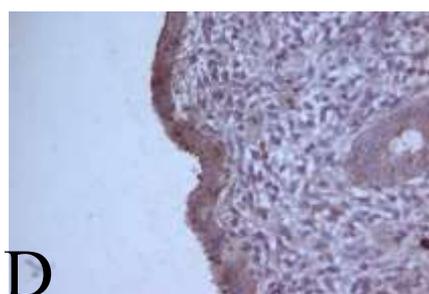
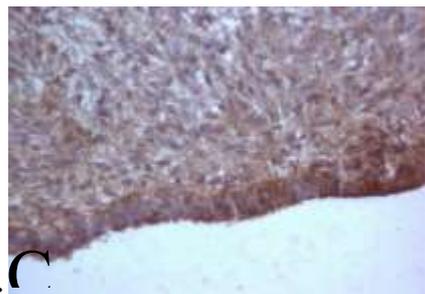
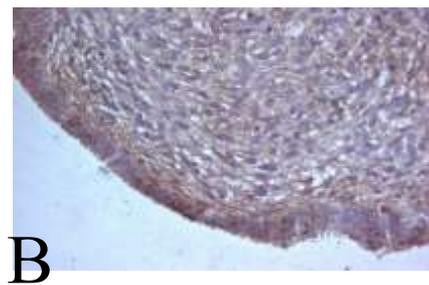
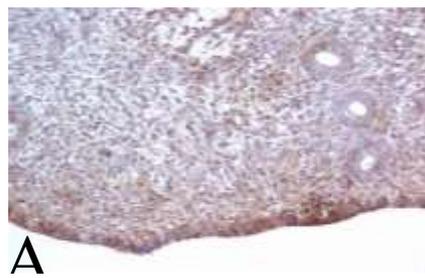


Figura 18.

A) Immunolocalizzazione della proteina S100. La marcatura, indipendente dal diametro delle fibre e dal loro grado di mielinizzazione, è prevalente a livello epiteliale e peristromale. Ingrandimento originale 20X.

B) Immunolocalizzazione della enolasi neurone specifica (NSE). La marcatura, indipendente dal diametro delle fibre e dal loro grado di mielinizzazione, è prevalente in regione sottoepiteliale e substromale. Ingrandimento originale 40X.

C) Immunopositività diffusa del peptide intestinale vasoattivo (VIP), prevalentemente in regione sottoepiteliale e peristromale. Ingrandimento originale 40X.

D) Immunolocalizzazione della sostanza P, prevalentemente epiteliale, con marcatura perighiandolare molto debole. Ingrandimento originale 40X.

Fig. 19. *Analisi immunoistochimica in pazienti del Gruppo A.*

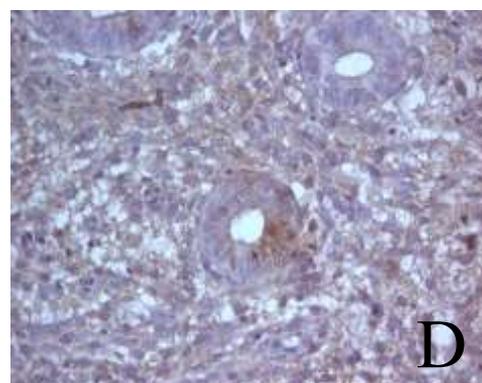
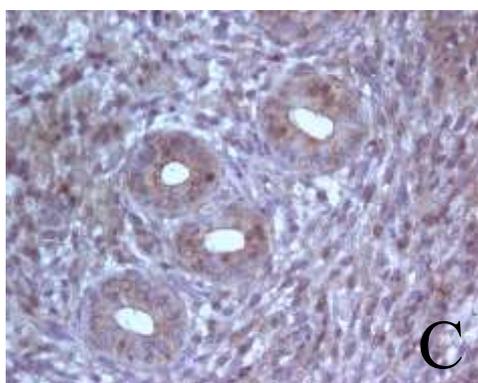
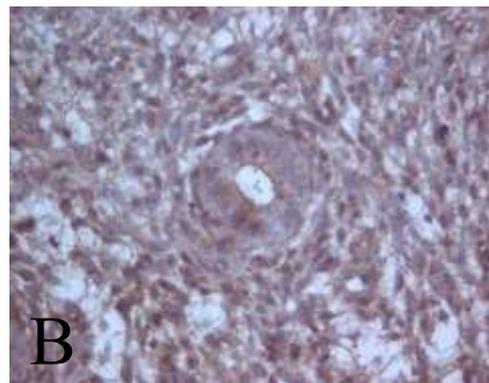
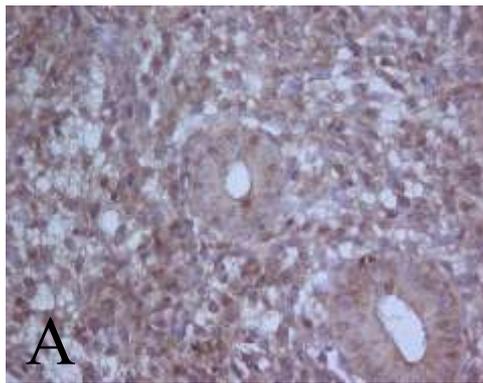


Figura 19.

A) B) *Immunopositività del recettore per la neurokinina 1 (NK-1). La marcatura per i recettori risulta molto più diffusa rispetto agli altri marcatori. Ingrandimento originale 40X.*

C) *Immunolocalizzazione della neurokinina A (NK-A) La marcatura è prevalente in regione perigliandolare e peristromale. Ingrandimento originale 40X.*

D) *Immunolocalizzazione della neurokinina B (NK-B). La marcatura risulta molto debole. Ingrandimento originale 40X.*

ANALISI CRITICA

Oggi giorno, l'isteroscopia ambulatoriale rappresenta il gold-standard per la valutazione della cavità uterina.

Essa può essere eseguita in regime ambulatoriale (*outpatient o office hysteroscopy*) oppure come procedura di day-surgery in anestesia generale (*inpatient hysteroscopy*).

I continui progressi cui si è assistito negli ultimi 15 anni hanno reso la chirurgia isteroscopica sempre più sicura e meno invasiva per la paziente, permettendo di eseguire un numero sempre maggiore di procedure operative in regime ambulatoriale, senza la necessità di alcuna analgesia e/o anestesia e con un sostanziale risparmio sui costi.

Questa nuova filosofia (“*see & treat hysteroscopy*”) semplifica la distinzione tra fase diagnostica e fase operativa, introducendo il concetto di una singola procedura in cui la fase operativa é perfettamente integrata con quella diagnostica.

Il razionale, alla base della possibilità di eseguire procedure operative a livello ambulatoriale senza l’uso di analgesia o anestesia, risiede nelle caratteristiche anatomiche dell’utero. Infatti, é da tempo riconosciuto che il miometrio, l’interfaccia endometrio-miometrio e la porzione piú profonda dello strato basale endometriale possiedono fibre nervose, ma queste sono assenti nei 2/3 superficiali dell’endometrio (strato funzionale) e nel tessuto fibrotico (Coupland, 1969).

Alcuni Autori (Haase, 1997; Zoubina, 1998) hanno però dimostrato la presenza di fibre nervose anche a livello endometriale, ma in densità significativamente inferiore rispetto a quelle del sottostante strato muscolare. Altri studi a riguardo hanno però riscontrato fibre nervose solo nell’endometrio di donne con patologie ginecologiche estrogeno-dipendenti, quali endometriosi, fibromatosi uterina, adenomiosi (Tokushige, 2006 [A]; Tokushige, 2006 [B]; Al-Jefout, 2007; Wang, 2009).

L’esperienza clinica in ambito isteroscopico ci ha insegnato che la gran parte delle donne che vengono sottoposte ad isteroscopia operativa ambulatoriale avverte soltanto un minimo fastidio/dolore durante le procedure in cui l’endometrio viene sollecitato (es. biopsia endometriale, polipectomia), mentre una quota non trascurabile di pazienti manifesta una intensa iperalgesia ogni qual volta strumenti meccanici e/o elettrodi bipolari stimolano l’endometrio stesso, lasciando intravedere la presenza ed un potenziale ruolo delle fibre nervose sensitive a carico dell’endometrio nella genesi di tale dolore.

Allo scopo di far luce sulla presenza, nonché sulla funzione di una innervazione endometriale sulla patogenesi del dolore/discomfort durante le isteroscopie operative ambulatoriali, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, abbiamo analizzato campioni biotici di endometrio di pazienti sottoposte a procedure “see and treat”, ricercando con metodica immunoistochimica la presenza di specifici marker neuronali .

Tra le varie possibilità di elicitazione endometriale (sollecitazione meccanica con la punta dell’isteroscopio, polipectomia, curettage con cannula di Novak o con Pipelle) la nostra scelta è ricaduta sulla biopsia endometriale isteroscopica, data la facilità e rapidità di esecuzione, la buona compliance nella stragrande maggioranza delle pazienti, nonché la possibilità di ottenere adeguato materiale per una corretta analisi immunoistochimica.

In base al grado di discomfort/dolore durante tale fase della procedura isteroscopica (fase IV), ciascuna paziente è stata assegnata ad uno dei due gruppi di studio (Gruppo A : Vas score > 2; Gruppo B: VAS score \leq 2)

Nel Gruppo A è stato dimostrato un incremento statisticamente significativo del contenuto di S100, NSE, VIP, NPY, NKA, NKR1 ($p < 0.05$) rispetto al Gruppo B. Dal momento che tali markers, con l’eccezione di S100 e NSE , sono specifici di fibre nervose amieliniche di piccolo calibro, si può supporre che lo strato funzionale dell’endometrio possa essere innervato da fibre sensitive di tipo C. Questa ipotesi è supportata dagli studi di Tokushige (2007), il quale sostiene che donne con endometriosi presentano fibre C di tipo sensitivo nello strato funzionale dell’endometrio, mentre lo strato basale è composto da un misto di fibre sensitive C, A δ e adrenergiche. D’altra parte, l’elevata immunopositività per

S100 e NSE, neuromediatori indipendenti dal diametro delle fibre e dal loro grado di mielinizzazione, si può ipotizzare la presenza di altre terminazioni nervose sensitive a livello dello strato funzionale dell'endometrio. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per confermare tale ipotesi.

Il passo successivo è stato poi quello di valutare se la presenza di tali fibre nervose a livello endometriale fosse un fatto costituzionale o legato alla presenza di alcune patologie estrogeno-dipendenti. La percentuale di pazienti affette da endometriosi/fibromiomas uterina è risultata significativamente superiore nel Gruppo A rispetto al Gruppo B ($p = 0.018$).

Dai risultati ottenuti si può concludere che la presenza di fibre nervose a livello dello strato funzionale dell'endometrio potrebbe essere un fattore responsabile del dolore, oltre a quelli già riconosciuti dalla letteratura e, che tale reperto potrebbe essere conseguenza della presenza di patologie ginecologiche estrogeno-dipendenti, come l'endometriosi e la fibromiomas uterina. Tale dato è in accordo con Fraser e coll. che hanno dimostrato la presenza di fibre nervose in tutti i campioni di curettage endometriale, prelevati da donne con endometriosi e/o fibromiomas uterina.

Nel nostro studio, a differenza di Fraser e coll., non tutte le donne con endometriosi/miomatosi presentavano fibre nervose a livello endometriale ed inoltre alcune pazienti avevano un VAS score basso pur in presenza di fibre nervose. Ciò lascia, quindi, presagire che altri fattori e/o patologie potrebbero essere coinvolte nella maggiore o minore espressione di fibre nervose a livello endometriale.

Studi al riguardo si rendono necessari anche perché in futuro l'isteroscopia con biopsia endometriale potrebbe rappresentare un importante strumento

diagnostico indiretto per dimostrare la presenza di patologie uterine e/o extrauterine.

Parte 3

III linea di ricerca: La vaginoscopia nell'identificazione dell'endometriosi vaginale

Cap.1

L' ENDOMETRIOSI: ETIOLOGIA E PATOGENESI

L' endometriosi è una condizione di patologia provocata dalla disseminazione o dalla crescita di tessuto endometriale in sedi anomale o dall'insorgenza del tessuto endometriale, per un processo di metaplasia, al di fuori della sede abituale. La malattia viene considerata una eterotopia.

L'endometrio ectopico risente, come la normale mucosa uterina, degli stimoli da parte degli ormoni ovarici, soprattutto estrogeni, ed assume quindi atteggiamenti proliferativi e funzionali (compreso lo sfaldamento e il sanguinamento in epoca mestruale) simili a quelli che si verificano nell'endometrio normale.

È quindi una malattia quasi sempre dell'età feconda e nella quale è presente l'attività ovarica, si verifica eccezionalmente in età puberale e raramente nell'adolescenza. Tende a regredire nella post-menopausa o dopo castrazione. È più frequente nelle nullipare. (Shaw 1995, Candiani 1999, Venturini 1999).

L'endometrio ectopico si reperisce di solito sul peritoneo pelvico e negli organi pelvici (ovaie, tube, intestino, retto-sigma, legamenti uterini, setto retto-vaginale, vescica, ecc.). L'endometriosi può inoltre insorgere in organi e tessuti al di fuori o lontani dalla pelvi (ombelico, vulva, cicatrici di interventi laparotomici, appendice, polmoni, ecc.). (Danesino 1987).

L'eziopatogenesi dell'endometriosi rimane a tutt'oggi non ancora chiarita. Sebbene l'esatta prevalenza dell'endometriosi nella popolazione generale non sia conosciuta, essa rappresenta una patologia frequente tra le donne in età riproduttiva. Dati Onu riguardanti la malattia, infatti, attestano che circa 3 milioni di donne in Italia soffrono di endometriosi, 14 milioni nell'Unione Europea (il 7-10 % della popolazione generale femminile), 5,5 milioni nel Nord America. Le stime di incidenza della patologia (che possono però variare enormemente) si attestano intorno al 7-10 % di donne in età fertile. Nel 2004 nel nostro Paese una rilevazione del Census Bureau ha evidenziato una prevalenza di 2.902.873 persone su una popolazione di circa 58.057.477 abitanti.

L'endometriosi rappresenta una delle patologie ginecologiche più controverse: infatti, nonostante il particolare interesse riservatole negli ultimi decenni dall'intera comunità scientifica e la notevole esperienza clinica acquisita in materia, resta, ad oggi, un enigma da risolvere nella quasi totalità delle sue radici ed implicazioni fisiopatologiche.

Un ampio studio italiano, condotto dal "gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi" comprendente 23 centri distribuiti in tutto il Paese, ha dimostrato una prevalenza di endometriosi pelvica in pazienti sottoposte ad intervento chirurgico per sterilità, dolore pelvico, patologia ovarica benigna e fibromi uterini rispettivamente del 30, 45, 35 e 12 %. Nel gruppo di pazienti affette da sterilità, inoltre, la prevalenza dell'endometriosi è risultata del 51% allo stadio I, del 22% allo stadio II, del 20 % allo stadio III e del 7% allo stadio IV. Percentuali simili sono state osservate in caso di fibroma uterino e dolore pelvico, mentre in donne con patologia ovarica benigna lo stadio III è risultato il più frequente. (Gruppo Italiano per lo studio dell' endometriosi 1994).

FATTORI DI RISCHIO

Età:

L'età è la sola caratteristica socio-demografica per la quale è stata osservata un'associazione positiva con la malattia. L'endometriosi pelvica è rara prima del menarca e tende a diminuire dopo la menopausa (Eskenazi 1997). La patologia, comunque, risulta essere poco frequente nelle adolescenti (Sanfilippo 1994).

Classe sociale, razza e stile di vita:

È stato osservato che l'incidenza dell'endometriosi risulta essere aumentata nelle donne di classe sociale più elevata, nelle donne asiatiche rispetto alle caucasiche, e ancora nelle donne bianche rispetto alle nere (Chatman 1976, Houston 1984). Questi risultati sono tuttavia influenzati da diversi bias quali la differente possibilità di usufruire di cure mediche adeguate o di ricorrere alla contraccezione, o ancora la parità e la diversa storia ginecologica (fattori mestruali).

In studi più recenti altri autori non hanno riscontrato alcuna associazione tra endometriosi e classe sociale (Cramer 2002).

La prevalenza dell'endometriosi, inoltre, diminuisce in rapporto ad alcuni stili di vita che includono il fumo di sigaretta e l'esercizio fisico, che sembrerebbero implicati in una diminuzione dei livelli sierici di estrogeni; un aumentato rischio sembra invece essere associato al consumo di alcool e caffeina (Cramer 1986, Cramer 2002). Sembra, infatti, che l'endometriosi sia una patologia estrogeno-dipendente e che gli estrogeni abbiano un ruolo di primaria importanza nella crescita e nel mantenimento delle lesioni endometriosiche.

Inoltre, l'aumentata incidenza della malattia endometriosa nei paesi industrializzati ha condotto alcuni autori ad indagare sulla possibile associazione tra uno dei più dannosi componenti ambientali inquinanti, la diossina, e l'endometriosi (Pauwels 2001, Birnbaum 2002) con risultati discordanti: un solo studio, infatti, riporta che il 18% delle donne con endometriosi risultava essere positiva alla diossina rispetto al 3% di donne senza endometriosi (Mayani 1997).

Fattori riproduttivi e mestruali

È stato osservato che il menarca precoce (≤ 12 anni), i cicli mestruali brevi, la durata maggiore del ciclo (>7 giorni), l'uso di tamponi sono associati con un rischio più elevato di sviluppare endometriosi; cicli mestruali >35 giorni sembrano invece avere un effetto protettivo (Pan 1993, Darrow 1993, Vignano 2004).

Lo sviluppo di endometriosi nei primi anni dopo il menarca è stato associato con un alto tasso di patologie ostruttive del tratto genitale che includono la stenosi cervicale, l'atresia cervicale e l'imene imperforato. Sembra inoltre che, nel gruppo di donne affette da anomalie Mulleriane, quelle con ostacolato deflusso al sangue mestruale presentino un rischio maggiore di sviluppare endometriosi rispetto alle donne non affette da tali anomalie dello sviluppo embriogenetico (Cramer 2002).

Riguardo alla storia ostetrica, dati clinici ed epidemiologici suggeriscono che la parità è inversamente associata al rischio di sviluppare la malattia endometriosa, indicando un effetto protettivo diretto dello stato gravidico. Tra le pluripare, si è osservato un lineare decremento del rischio con l'aumentare del numero di figli

nati vivi e del periodo di lattazione (Missmer 2004): ciò può essere dovuto ad una ridotta esposizione ai flussi mestruali.

Utilizzo di contraccettivi orali

I dati relativi all'associazione tra assunzione di contraccettivi orali (CO) ed endometriosi sono contrastanti.

Alcuni autori hanno ipotizzato che l'uso di CO è associato ad un elevato rischio di sviluppare la patologia (Vercellini 1993, Parazzini 1999).

Secondo studi più recenti, le utilizzatrici di CO avrebbero un rischio di malattia inferiore. I CO, dunque, potrebbero prevenire lo sviluppo di endometriosi rendendo quantitativamente minore il flusso mestruale con un conseguente ridotto rischio di reflusso mestruale trans-tubarico in cavità peritoneale. I CO sono infatti stati proposti come terapia a donne con endometriosi sintomatica (Vercellini 2003, Maia 2008).

Fattori genetici

I dati clinici che sostengono l'ipotesi di una possibile base genetica dell'endometriosi sono la ricorrenza familiare dell'endometriosi, la concordanza in gemelli monozigoti, l'età di insorgenza simile in sorelle non gemelle entrambe affette, la prevalenza aumentata di 6-9 volte rispetto alla popolazione generale nelle parenti di primo grado di donne affette, una prevalenza di malattia, determinata mediante risonanza magnetica, del 15% nelle sorelle di donne con endometriosi grave (Tabella 1) (Simpson 1980, Moen 1993, Moen 1994, Kennedy 1998). È dunque ipotizzabile che la trasmissione dell'endometriosi sia riconducibile ad un pattern poligenico/multifattoriale.

L'OXEGENE study, uno studio britannico condotto allo scopo di indagare le cause genetiche della malattia endometriosica e volto ad identificare i loci coinvolti nello sviluppo della malattia utilizzando analisi di linkage, ha confermato una tendenza familiare allo sviluppo di endometriosi (Kennedy 1998, Kennedy 1999).

Tabella 1. Associazioni genetiche dell'endometriosi

<i>Autori</i>	<i>Risultati</i>
Simpson et al., 1980	Rischio di endometriosi aumentato di 6 volte nelle sorelle di donne affette
Moen e Magnus, 1993	Rischio relativo di endometriosi aumentato (OR 7.2 (p< 0.05)) con una parente di primo grado affetta da malattia
Moen, 1994	Sei sorelle di otto gemelle monozigoti(75%) con endometriosi anch'esse con malattia
Kennedy et al., 1998	Prevalenza di endometriosi in parenti di primo grado di donne affette. 14,3%

PATOGENESI

Molte teorie hanno cercato di spiegare il meccanismo patogenetico della malattia.

Le varie ipotesi affermano che l' endometriosi si stabilirebbe per:

Reflusso tubarico di sangue mestruale ed impianto dei frustoli endometriali nei vari tessuti

I frustoli di mucosa uterina non solo avrebbero la capacità di impiantarsi ma verrebbero poi stimolati a crescere dalla ciclica azione degli estrogeni ovarici.

Con i cicli mestruali, tali impianti sarebbero soggetti a proliferazione e a sanguinamento, con la conseguente possibilità di ulteriori impianti endometriali.

Dal momento che la mestruazione retrograda è così frequente da essere considerata un fenomeno fisiologico, la possibilità di sviluppare endometriosi dipenderebbe dal rapporto tra quantità di endometrio refluito in cavità peritoneale e recettività intrinseca all'impianto delle cellule endometriali.

Questa teoria spiega in modo soddisfacente le localizzazioni endopelviche ed endoaddominali della malattia ma non spiega altre localizzazioni come quelle vaginali, vulvari, perineali, polmonari, ecc.

Disseminazione per via linfatica o per via ematica

Le cellule endometriali vitali potrebbero entrare nei vasi sanguigni e linfatici con conseguente embolizzazione ed impianto in sedi ectopiche. Questa teoria potrebbe spiegare la presenza di endometriosi a livello polmonare, renale, della muscolatura scheletrica e dello spazio subaracnoideo (diffusione ematogena). Allo stesso modo, i focolai endometriosisi riscontrati in alcuni linfonodi potrebbero essere il risultato di una diffusione linfatica.

Metaplasia dell'epitelio di origine celomatica o mülleriana

Secondo tale teoria, l'endometrio ectopico originerebbe da cellule totipotenti mesoteliali del peritoneo attraverso un processo di metaplasia. Questa teoria assume maggior valore in virtù del fatto che l'epitelio celomatico, che dà origine alle cellule epiteliali dei dotti Mülleriani, si differenzia anche in cellule epiteliali pleuriche e peritoneali così come in cellule della superficie ovarica. La possibilità che la metaplasia potesse essere determinata da fattori di induzione fu suggerita per la prima volta da Novak. I fattori capaci di indurre questo tipo di metaplasia del peritoneo sono gli ormoni sessuali, il reflusso tubarico di detriti endometriali, i

processi flogistici. La teoria della metaplasia celomatica può spiegare la presenza di endometriosi primitiva del setto retto-vaginale e di certe localizzazioni a livello del torace o degli arti perché il tessuto celomatico partecipa anche all'organogenesi di questi apparati. Spiega anche la segnalazione di rarissimi casi di endometriosi in pazienti con agenesia utero-vaginale e il reperto di endometriosi nelle cisti dermoidi.

Sono stati descritti anche focolai di endometriosi in soggetti maschili. Si pensa che la presenza di tessuto endometriale in questi uomini possa derivare da resti di cellule mülleriane, sviluppatasi da residui embrionali di abbozzi genitali quali l'utricolo prostatico e l'appendice testis, a seguito di una stimolazione ad opera di cure con estrogeni. Le segnalazioni riguardano infatti soggetti con carcinoma prostatico trattati con clorotrianisene (TACE), un estrogeno non steroideo.

Disseminazione chirurgica

Sicuramente responsabile di certe localizzazioni come quella sulle cicatrici laparotomiche che si verificano dopo interventi di apertura della cavità uterina (miomectomia, metroplastica) o comunque di interventi attuati su organi pelvici che possono essere responsabili delle localizzazioni a livello vulvo-perineale.

Più difficilmente si forma una endometriosi nella cicatrice addominale dopo taglio cesareo o nella cicatrice della sutura di una perineorrafia eseguita per lacerazione nel corso del parto o infine nel punto dell'infissione dell'ago per una amniocentesi. Ciò significa che quando, a causa di uno stato gravidico, l'endometrio ha subito la trasformazione deciduale ha meno tendenza ad impiantarsi.

Predisposizione genetica

(Vedi **Fattori di rischio**)

Alterazioni del sistema immunitario

I risultati di molte ricerche hanno fatto ipotizzare che l' endometriosi sia dovuta ad una alterazione del sistema immunitario e precisamente ad una diminuzione dell' immunità cellulo-mediata e dell'immunità umorale (Dmowski 1988, Montemagno 1988) .

Cap.2

ENDOMETRIOSI VAGINALE

Gli impianti endometriosisici che invadono lo spazio retroperitoneale per una dimensione di 5 mm o più sono definiti come endometriosi profondamente invasiva e tipicamente coinvolgono il cavo di Douglas (endometriosi retrocervicale) e il setto rettovaginale. L'endometriosi vaginale è di solito considerata un impianto secondario di foci endometriosisiche che infiltrano il cavo di Douglas o nella maggior parte dei casi il setto rettovaginale.

NOSTRA ESPERIENZA

Nel corso del 2011 presso il nostro dipartimento sono state reclutate venti donne tra 37 e 42 anni che presentavano severa dispareunia. L'esame vaginale ha rivelato soltanto multiple e soffici irregolarità del fornice posteriore.

Tutte le pazienti arruolate sono state sottoposte ad isteroscopia diagnostica, attraverso l'utilizzo di un isteroscopio rigido, a flusso continuo, di calibro 5 mm, dotato di una ottica a visione foro-obliqua di 30° (*“Office Continuous Flow Operative Hysteroscope”*. Karl Storz Endoscopy, Tuttlingen, Germany).

Non é stata impiegata alcuna premedicazione farmacologica, né anestesia locale. L'esame é stato eseguito con approccio vaginoscopico, ovvero senza l'impiego di speculum e pinza da collo.

La distensione della cavità uterina é stata ottenuta mediante soluzione salina, erogata automaticamente da una pompa elettronica di irrigazione/aspirazione (Endomat; Karl Storz, GmbH & Co), in modo tale da mantenere una pressione endovaginale tra 30 e 50 mmHg

L'illuminazione è stata fornita da una fonte luminosa allo Xenon da 300 W. Le immagini sono state visualizzate su un monitor a colori ad alta risoluzione, utilizzando una telecamera a circuito integrato e tutte le procedure sono state videoregistrate dall'introduzione dell'isteroscopio fino alla sua estrazione.

L'esame vaginoscopico ha mostrato la presenza, in 15 pazienti, di lesioni marroncine, polipoidi, peduncolate della misura di 0,5-1 cm nel fornice vaginale posteriore che sono state drenate con un elettrodo bipolare 5 Fr. In 5 pazienti l'esame isteroscopico è risultato negativo.

Forbici e pinze da biopsia 5Fr sono state rispettivamente usate per tagliare e raccogliere campioni di queste lesioni che sono stati prontamente inviate per l'esame istologico.

L'analisi istologica di questi campioni ha confermato il sospetto clinico di endometriosi. Le pazienti sono state quindi sottoposte a laparoscopia che ha mostrato piccole lesioni nodulari del setto rettovaginale che sono state completamente asportate.

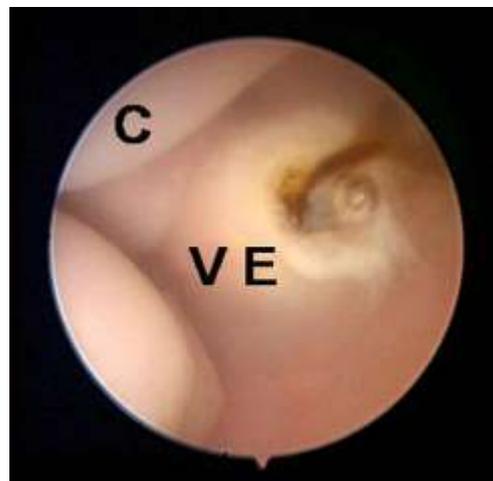
CONCLUSIONI

Potrebbe quindi essere di fondamentale importanza esaminare la vagina con l'approccio vaginoscopico in donne che presentano dispareunia severa.

La diagnosi di endometriosi vaginale potrebbe, infatti, rappresentare una grande opzione diagnostica da associare al solo esame fisico, in quanto la vaginoscopia operativa permette di identificare ed esaminare istologicamente le lesioni.

RISULTATI

Nel 90% dei casi sono state individuate isteroscopicamente delle lesioni che analizzate poi istologicamente hanno confermato il sospetto clinico di endometriosi vaginale quindi questi risultati sono senz'altro incoraggianti ma il disegno dello studio prevede ovviamente il reclutamento di altri casi prima di trarre le definitive conclusioni



Bibliografia

Bettocchi S, Selvaggi L. (1997) A vaginoscopic approach to reduce the pain of office hysteroscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 4(2): 255-8

Cameron ST, Walker J, Chambers S et al. (2001) Comparison of transvaginal ultrasound, saline infusion sonography and hysteroscopy to investigate postmenopausal bleeding and unscheduled bleeding on HRT. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 30, 291-294.

Campo R, Van Belle Y, Rombauts L, Brosens I, Gordts S. (1999) Office mini-hysteroscopy. *Hum Reprod Update* 5, 73-81.

Campo R, Molinas CR, Rombauts L, Mestdagh G, Lauwers M, Braekmans P, et al. Prospective multicentre randomized controlled trial to evaluate factors influencing the success rate of office diagnostic hysteroscopy. *Hum Reprod* 2005;20:258-63.

Cicinelli E, Parisi C, Galantino P, Pinto V, Barba B, Schonauer S. (2003) Reliability, feasibility, and safety of minihysteroscopy with a vaginoscopic approach: experience with 6,000 cases. *Fertil Steril* 80, 199-202.

Cicinelli E. (2005) Diagnostic minihysteroscopy with vaginoscopic approach: rationale and advantages. *J Minim Inv Gynecol* 12, 396-400.

De Angelis C, Perrone G, Santoro G, Nofroni I, Zichella L. (2003) Suppression of pelvic pain during hysteroscopy with a transcutaneous electrical nerve stimulation device. *Fertil Steril* 79(6), 1422-1427.

De Iaco P, Marabini A, Stefanetti M. (2000) Acceptability and pain of outpatient hysteroscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 7, 71-75.

Finikiotis G. (1990) Outpatient hysteroscopy: pain assessment by visual analogue scale. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 30, 89-90.

Guida M, Pellicano M, Zullo F, Acunzo G, Lavitola G, Palomba S, Nappi C. (2003) Outpatient operative hysteroscopy with bipolar electrode: a prospective multicentre randomized study between local anaesthesia and conscious sedation. *Hum Reprod* 18, 840-843.

Kremer C, Duffy S, Moroney M. (2000) Patient satisfaction with outpatient hysteroscopy versus day case hysteroscopy: randomized controlled trial. *BMJ* 320, 279-282.

Lau WC, Ho RYF, Tsang MK et al. (1999) Patient's acceptance of outpatient hysteroscopy. *Gynecol Obstet Invest* 47, 191-193.

Marana R, Marana E, Catalano GF. (2001) Current practical application of office endoscopy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13:383-7.

Nagele F, O'Connor H, Davies A. et al (1996) 2500 outpatient diagnostic hysteroscopies. *Obstet Gynecol* 88, 87-92.

Paschopoulos M, Paraskevaides E, Stefanidis K, Kofinas G, Lolis D. (1997) Vaginoscopic approach to outpatient hysteroscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 4, 465-467.

Pellicano M, Guida M, Zullo F, Lavitola G, Cirillo D, Nappi C. (2003) Carbon dioxide versus normal saline as a uterine distension medium for diagnostic vaginoscopic hysteroscopy in infertile patients: a prospective, randomized, multicenter study. *Fertil Steril* 79, 418-421.

Sharma M, Taylor A, Di Spiezio Sardo A, Buck L, Mastrogamvrakis G, Kosmas I, Tsirkas P, Magos A. (2005) Outpatient hysteroscopy: traditional versus the 'no-touch' technique. *BJOG* 112, 963-7.

Yang J, Vollenhoven B. (2002) Pain control in outpatient hysteroscopy. *Obstet Gynecol Surv* 57 (10), 693-702.

Baggish M. S., Barbot J, Valle R. F. Diagnostic and Operative Hysteroscopy. A text and atlas. Mosby, Inc.(1999).

Blanc B., Marty R., de Montgolfier R. Office and Operative Hysteroscopy. Springer Verlag France 2002.

Al-Jefout M, Andreadis N, Tokushige N, Markham R, Fraser I. A pilot study to evaluate the relative efficacy of endometrial biopsy and full curettage in making a diagnosis of endometriosis by the detection of endometrial nerve fibers. Am J Obstet Gynecol 2007; 197:578.e1-4.

Atwal G, Du Plessis D, Armstrong G, Slade R, Quinn M. Uterine innervation after hysterectomy for chronic pelvic pain with, and without, endometriosis. Am J Obstet Gynecol 2005; 193:1650–1655.

Baggish M.S., Valle R.F., Guedj H. Hysteroscopy. Verduci Editore 2008

Balasubramaniam A. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists. Peptides 1996; 18: 445-57.

Bettocchi S, Selvaggi L. A vaginoscopic approach to reduce the pain of office hysteroscopy. J Am Assoc Gynecol Laparosc. 1997;4:255–

Barboni GC, Bastianini A, Brizzi E, Castorina S, Comparini L, donato RF, Filogamo G, Fusaroli P, Lanza GG, Grossi CE, Manzoli FA, Marinossi G, Miani A, Mitolo V, Motta P, Nesci E, Orlandini GE, Passaponti A, Pizzini G, Reale E,

Renda T, Ridola C, Ruggeri A, Santoro A, Tedde G, Zaccheo D. Anatomia Umana. Edi-ermes. 2000.

Broadbent JAM, Hill NCW, Molnar BG, Rolfe KJ, Magos AL. Randomized placebo controlled trial to assess the role of intracervical lignocaine in outpatient hysteroscopy. Br J Obstet Gynaecol 1992; 99:777–780.

Brum JM, Bove AA, Sufan Q, Reilly W, Go VL. Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation. J Am Coll Cardiol. 1986 Feb; 7 (2): 406-13.

Burkitt HG, Young B, Heath JW. The female genital organs. In: Wheater's functional histology. Longman Group UK Limited, London, UK 1993; pp. 335–365.

Cavallotti C, Moscarini M, Bartolelli C, Nagar B. Neurotrasmissione del distretto circolatorio utero-ovarico-vaginale. Atti del I Congresso Interregionale di Ostetricia e Ginecologia. Cassino, 22-23 Sett.; pag 1-21, 1984.

Cicinelli E, Didonna T, Ambrosi G, Schönauer LM, Fiore G, Matteo MG. Topical anaesthesia for diagnostic hysteroscopy and endometrial biopsy in postmenopausal women: A randomized placebo-controlled double-blind study. Br J Obstet Gynaecol 1997;104:316–319.

Cicinelli E, Parisi C, Galantino P, Pinto V, Barba B, Schonauer S. Reliability, feasibility, and safety of minihysteroscopy with a vaginoscopic approach: experience with 6,000 cases. *Fertil Steril* 2003;80 (1) :199-202.

Coupland RE. The distribution of cholinergic and other nerve fibres in the human uterus. *Postgrad Med J* 1969; 45:78-79.

Dahlof C, Dahlof P, Tatemoto K, Lundberg JM. Neuropeptide Y reduces field stimulation-evoked release of noradrenaline and enhances the forces of contraction in the rat portal vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 1985; 328: 327-330.

Davies A, Richardson R, O'Connor H, Baskett TF, Nagele F, Magos AL. Lignocaine aerosol spray in outpatient hysteroscopy: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 1997;67:1019-1023.

De Iaco P, Marabini A, Stefanetti M. Acceptability and pain of outpatient hysteroscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2000; 7: 71-75.

De Neef P, Robberecht P, Chatelain P, Waelbroeck M, Christophe J. The in vitro chronotropic and inotropic effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the atria and ventricular papillary muscle from the *Cynomolgus* monkey heart. *Reg Pept* 1984; 8: 237-244.

Ding WG, Koyama S, Fujimura M, Miyazaki, Kimura H. CGRP and PYY Immunoreactive structures in the pancreas of various vertebrates. 8th International Symposium on gastrointestinal hormones 1990. 46 (1): 62.

Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function. *Digestion* 1979; 19: 149-69.

Fahrenkrug J. VIP and autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther* 1989; 41(3): 515-34.

Feliciano L, Henning RJ. Vagal nerve stimulation releases vasoactive intestinal peptide which significantly increases coronary artery blood flow. *Cardiovasc Res* 1998; 40 (1): 45-55.

Feng QP, Hedner T, Andersson B, Lundberg JM, Waagstein F. Cardiac neuropeptide Y and noradrenaline balance in patients with congestive heart failure. *Br Heart J* 1994; 71: 261-7.

Franco-Cecereda A, Lundberg JM, Dahlof C. Neuropeptide Y and sympathetic control of heart contractility and coronary vascular tone. *Acta Physiol Scand* 1985; 124: 61-369.

Fried G, Lundberg JM, Theodorsson-Norheim E. Subcellular storage and axonal transport of neuropeptide Y in relation to catecholamines in the cat. *Acta Physiol Scand* 1985; 125: 45-154.

Ganz P, Sandrock AW, Landis SC, Leopold J, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Vasoactive intestinal peptide: vasodilatation and cyclic AMP generation. *Am J Physiol* 1986; 250 (5 Pt 2): H755-60.

Giorda G, Scarabelli C, Franceschi S, Campagnutta E. Feasibility and pain control in outpatient hysteroscopy in postmenopausal women: A randomized trial. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 593–597.

Goldfarb HA. D & C results improved by hysteroscopy. *N Engl J Med* 1989; 86: 277–279.

Guida M, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, Sparice S, Bramante S, Piccoli R, Bifulco G, Cirillo D, Pellicano M, Nappi C. Vaginoscopic versus traditional office hysteroscopy: a randomized controlled study. *Hum Reprod.* 2006; 21(12): 3253-7.

Haase EB, Buchman J, Tietz AE, Schramm LP. Pregnancy induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res* 1997; 288: 293–306.

Haass M., Hock M., Richardt G., Schomig A.. Neuropeptide Y differentiates between exocytotic noradrenaline release in guinea pig heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 1989; 340: 509-515.

Hamou J, Hysteroscopie et microcolpohysteroscopie. CoFeSe Palermo 1984

Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, [Journot L](#), [Laburthe M](#), [Pisegna JR](#), [Rawlings SR](#), [Robberecht P](#), [Said SI](#), [Sreedharan SP](#), [Wank SA](#), [Waschek JA](#). International Union of Pharmacology. XVII Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 265-270.

Healey DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 736-40.

Hökfelt T, Johansson O, Ljundahl A, Lundberg JM, Schultzberg M. Peptidergic neurones. *Nature* 1980; 284: 515-21.

Jacobs JW, Goodman RH, Chin WW. Calcitonin messenger RNA encodes multiple polypeptides in single precursor. *Science* 1981; 213: 457-459.

Jones DM, Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM. The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI-3 kinase signaling pathway. *J Neurochem* 2003; 86: 1116-28

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principi di Neuroscienze*. Casa Editrice Ambrosiana, 1994, II edizione.

Kimpinski K, Mearow K. Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons: role of

phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase. J Neurosci Res 2001; 63:486-99.

Kremer C, Barik S, Duffy S. Flexible outpatient hysteroscopy without anaesthesia: A safe, successful and well tolerated procedure. Br J Obstet Gynaecol 1998; 105: 672–676.

Kremer C, Duffy S, Moroney M. Patient satisfaction with outpatient hysteroscopy versus day case hysteroscopy: Randomized controlled trial. BMJ 2000;320: 279–282.

Jovanovic A, Jovanovic S, Tulic I, [Grbović L](#). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. Mol Hum Reprod 1998; 4: 71-76.

Lambertini. Manuale di Anatomia dell’Uomo. Piccin Editore. 1968.

Lacroix JS. Adrenergic and non-adrenergic mechanisms in sympathetic vascular control of the mucosa nasale. Acta Physiol Scand 1989; 136(581): 1-63.

Larsson LI, Fahrenkrug J, Schaffalitzky De Muckadell O, Sundler F, Hakanson R, Rehfeld JR. Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and

peripheral neurons. *Proc Nat Acad Sci* 1976; 73: 3197-3200.

Lau WC, Tam WH, Lo WK, Yuen PM. A randomized double-blind placebo-controlled trial of transcervical intrauterine local anaesthesia in outpatient hysteroscopy. *Br J Obstet Gynaecol* 2000; 107: 610–613.

Lerner EJ, Jaffe M, Ree HJ, McDuff HC Jr. Proliferation of myometrial nerves in a patient with severe dysmenorrhea. *R J Med J* 1985; 68: 265-7.

Lewis SE, Mannion RJ, White FA, Coggeshall RE, Beggs S, Costigan M, Martin JL, Dillmann WH, Woolf CJ. A role for HSP27 in sensory neuron survival. *J Neurosci* 1998; 19: 8945-53.

Lindheim SR, Kavic S, Shulman SV, Sauer MV. Operative hysteroscopy in the office setting. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2000; 7: 65–69.

Linton-Dahlof P. Modulatory interactions of neuropeptide Y on sympathetic vascular tone. *Acta Physiol. Scand* 1989; 137(586): 1-85.

Lundberg JM, Hökfelt T, Änggård A, Terenius L, Elde R, Markey K, Goldstein

M, Kimmel J. Organizational principles in the peripheral sympathetic nervous system: subdivision by coexisting peptides (somatostatin-, avian pancreatic polypeptide-, and vasoactive intestinal polypeptide –like immunoreactive materials). *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 1303-7.

Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes & Dev* 1997; 11: 3341-50.

Minth C, Bloom S, Polak JM, Dixon J. Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4577-4581.

Morris JL, Murphy R. Evidence that neuropeptide Y released from noradrenergic axons causes prolonged contraction of the guinea pig uterine artery. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1988; 24: 241-249.

Nagele F, Lockwood G, Magos A. Randomized placebo controlled trial of mefenamic acid for premedication at outpatient hysteroscopy: A pilot study. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 842–844.

Nagele F, O'Connor H, Davies A. 2500 outpatient diagnostic hysteroscopies. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 87–92.

Nappi C. Ostetricia e Ginecologia. Ed. Idelson-Gnocchi. 2002

Nilsen J, Brinton RD. Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 2002; 143: 205-12.

Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Stefanidis K, Kofinas G, Lolis D. Vaginoscopic approach to outpatient hysteroscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1997;4 (4) :465-7.

Percopo V, Kaplan EL. GEP and multiple neuroendocrine tumors. Piccin 1996.

Pernow J. Co-release and functional interactions of neuropeptide Y and noradrenaline in peripheral sympathetic vascular control. *Acta Physiol Scand* 1988; 133(568): 1-56.

Polak JM, Van Noorden S. An introduction to immunochemistry, current techniques and problems. Oxford: Oxford University Press; 1997; 66-7.

Polak JM, Van Noorden S. Immunocytochemistry, practical application in pathology and biology, John Wright & Sons, Bristol; 1983; 51-4.

Potter EK. Prolonged non-adrenergic inhibition of cardiac vagal action following sympathetic stimulation: neuromodulation by neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.* 1985; 54: 117-121.

Raulais D, Hagaman J, Ontjes DA. The complete amino acid sequence of rat thyrocalcitonin. *Eur J Biochem* 1976; 64: 607-611.

Richardt G, Haass M, Neeb S, Hock M, Lang RE, Schomig A. Nicotine-induced release of noradrenaline and neuropeptide Y in guinea pig heart. *Klin Wochenschr* 1988; 66(11): 21-27.

Rosenfeld MG, Amara SG, Evans RM. Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. *Science* 1984; 225: 1315-1320.

Quinn M, Armstrong G. Uterine nerve fibre proliferation in advanced endometriosis. *J Obstet Gynaecol* 2004; 24: 932-3.

Quinn MJ, Kirk N. Differences in uterine innervation at hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1515-9.

Said SI, Mutt V. Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 1970; 225: 863-864.

Nappi C, Di Spiezio Sardo A. "See & Treat". Hysteroscopy in daily practice. Educational dvd 2008.

Sharpe-Timms K. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943 :131-47.

Smitherman TC, Sakio H, Geumei Am. Coronary vasodilatator action of VIP. In: Said SI, editor, *Vasoactive intestinal peptide*, NY: raven Press 1982; 169-76.

Soriano D, Ajaj S, Chuong T, Deval B, Fauconnier A, Daraï E. Lidocaine spray and outpatient hysteroscopy: Randomized placebo-controlled trial. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 661–664.

Sternberger NH, Sternberger LA. The unlabeled antibody method. Comparison of sensitivity of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex method by a new mode of quantitative immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1986; 34:599-605.

Tam WH, Yuen PM. Use of diclofenac as an analgesic in outpatient hysteroscopy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 2001; 76: 1070–1072.

Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y – a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 1982; 296: 659-62.

Testut. *Trattato di Anatomia Topografica*. Utet. 1977.

Tokushige N, Markham R, Russel P, Fraser IS. High density of small nerve fibers in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2006; 21: 782-7 [A].

Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Nerve fibers in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* 2006; 21: 3001-7 [B].

Towbin NA, Gviazda IM, March CM. Office hysteroscopy versus transvaginal ultrasonography in the evaluation of patients with excess uterine bleeding. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1678-1682.

Wang G, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Rich innervation of deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2009 Jan 16 [Epub ahead of print].

Yang J, Vollenhoven B. Pain Control in Outpatient Hysteroscopy. *Obstet Gynecol Survey* 2002; 57: 693-702.

Zaidi M, Chambers TJ, Bevis PJ. Effects of peptides from the calcitonin genes on bone cells. *Q J Exp Physiol* 1988; 73: 471-485.

Zoubina EV, Fan Q, Smith PG. Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *J Comp Neurol* 1998; 397: 561-571.

Zullo F, Pellicano M, Stigliano CM, Di Carlo C, Fabrizio A, Nappi C. Topical anesthesia for office hysteroscopy. *J Reprod Med* 1999; 44: 865-869.

Zupi E, Luciano AA, Valli E, Marconi D, Maneschi F, Romanini C. The use of topical anesthesia in diagnostic hysteroscopy and endometrial biopsy. *Fertil Steril.*1995; 63: 414-416.