



FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, HISTORIA DE LA CIENCIA Y
GINECOLOGÍA

MECANISMOS INMUNOSUPRESORES EN ENDOMETRIOSIS

Tesis doctoral

Lourdes Montesinos Llorca

Directoras:

Dra. Irene Velasco Ruiz

Dra. María Isabel Acién Sánchez

San Juan de Alicante, Septiembre 2015



ILDEFONSO HERNÁNDEZ AGUADO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, HISTORIA DE LA CIENCIA Y GINECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

INFORMA:

Que **D^a LOURDES MONTESINOS LLORCA**, ha realizado bajo la coordinación de este Departamento su memoria de Tesis Doctoral titulada “Mecanismos inmunosupresores en endometriosis”, cumpliendo todos los objetivos previstos, finalizando su trabajo de forma satisfactoria para su defensa pública y capacitándole para optar al Grado de Doctora.

Lo que certifico en Sant Joan d’Alacant, a 30 de Septiembre de 2015.

Fdo: Ildefonso Hernández Aguado
DIRECTOR





M^a Isabel Acién Sánchez, Doctora Europeo en Medicina y Cirugía y Profesora Asociada del Departamento de Salud Pública, Historia de la Ciencia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández; e Irene Velasco Ruiz, Doctora en Biología y Profesora Asociada al Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante

CERTIFICAN:

Que D^a LOURDES MONTESINOS LLORCA ha realizado íntegramente bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “Mecanismos inmunosupresores en endometriosis”, cumpliendo todos los objetivos previstos. Dicho trabajo está concluido de forma satisfactoria para su defensa pública para optar al GRADO DE DOCTOR ante un Tribunal.

Lo que certificamos en Sant Joan d'Alacant, a 30 de septiembre de dos mil quince.

Fdo: M^a Isabel Acién Sánchez

Fdo: Irene Velasco Ruiz



A mi familia, sobre todo a Jorge, por su apoyo y comprensión.

A papá: al final has conseguido que hiciera la tesis.

A Irene, porque sin ella este trabajo no habría sido posible.

A Maribel por toda su ayuda.





AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irene Velasco, que ha sido quien me ha guiado por este fascinante mundo de la Inmunología. Sin ti esta tesis no se habría llevado a cabo. Gracias por tus ánimos, por darme fuerzas para empezar y continuar, por los momentos de risas que han amenizado el camino y por tu paciencia.

A la Dra. Maribel Acién, por darme junto con Irene el empujón para empezar, por sus aportaciones, por su rapidez y tenacidad, y por relativizar y quitar hierro al asunto cuando ha sido necesario.

Al Prof. Dr. Pedro Acién, por su insistencia y apoyo en todo este proyecto. Que siempre conserve el entusiasmo con el que trabaja.

Al Dr. Francisco Quereda por introducirme en el mundo de la investigación a través de los cursos de doctorado y la suficiencia investigadora.

A mis compañeras de batalla, Eva, Montse, Nerea y Teresa. Menos mal que tenemos esos pequeños momentos para desahogarnos y apoyarnos.

Al Dr. Alberto Cordero por su inestimable colaboración en los aspectos estadísticos.

A la Dra. Esther Caparrós y a Laura Velásquez por su colaboración en la determinación de HLA-G mediante la técnica de Western Blot.



El presente trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado en las dependencias del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de San Juan en colaboración con el Laboratorio de Inmunología del Dpto. de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández, gracias a las siguientes ayudas de investigación:

- Fondo de Investigación Sanitaria, FIS 10/01815, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, y fondos FEDER dentro del Plan Nacional de I+D+i 2008-2011.
- Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana. Ayudas de investigación a Grupos Emergentes, GE-001/10 y GE-016/11.

Abreviaturas

17 β HSD-1: 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa.

ACO: anticonceptivos orales.

APC: antigen presenting cells (células presentadoras de antígeno).

APC: fluorocromo alofocianina.

ASRM: American Society for Reproductive Medicine (Sociedad Americana de Medicina Reproductiva).

AUC: area under curve (área bajo la curva).

BCR: B cell receptor (receptor de células B).

CA-125: cancer antigen 125 (antígeno tumoral 125).

CD: cluster of differentiation (grupo de diferenciación).

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad humana.

CRD: cuaderno de recogida de datos.

DC: dendritic cells (células dendríticas).

DIU: dispositivo intrauterino.

DS: desviación estándar.

DTT: dithiothreitol.

E2: estradiol.

EAV: escala analógico-visual.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: enzyme-linked immunoabsorbent assay (ensayo enzimático inmunoabsorbente).

ESRV: endometriosis del septo o tabique recto-vaginal.

FITC: fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína).

FSC: forward scatter (detector de dispersión frontal).

GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos).

GnRH-a: gonadotropin releasing hormone analogues (análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas).

HLA: human leukocyte antigen (antígeno leucocitario humano).

HR: hazard ratio.

HRP: horseradish peroxidase (enzima peroxidasa de rábano).

IC: intervalo de confianza.

IFN- γ : Interferón gamma.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleucina.

iTreg: linfocitos T reguladores inducibles.

KD: kilodaltons.

KIR: killer cell immunoglobulin-like receptor (receptor inhibidor de la actividad citotóxica de las células NK).

LE: líquido de endometrioma.

LL: low-left.

LP: líquido peritoneal.

LQ: líquido de quiste.

LR: low-right.

NK: células natural killer.

nTreg: linfocitos T reguladores naturales.

OR: Odds Ratio.

PE: fluorocromo ficoeritrina.

PGs: prostaglandinas.

Pm: peso molecular.

SSC: side scatter (detector de dispersión lateral).

T^a: temperatura.

Tc: linfocitos T citotóxicos.

TCR: T cell receptor (receptor de células T).

TGF- β : transforming growth factor beta (factor de crecimiento transformante beta).

TH: linfocitos T helper (cooperadores).

TMB: tetrametilbencidina.

TNF- α : tumor necrosis factor alpha (factor de necrosis tumoral alfa).

Treg: linfocitos T reguladores.

BD: Becton Dickinson.

UI: unidades internacionales.

UL: up-left.

UR: up-right.

VEGF: vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular).

VSG: velocidad de sedimentación globular.

WB: western blot.





Índice

INTRODUCCIÓN	21
1. EL SISTEMA INMUNE	23
1.1. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....	25
1.1.1. Linfocitos T	25
1.1.2. Linfocitos B	28
1.1.3. Células Natural Killer	30
1.1.4. Células Presentadoras de antígeno: Monocito-macrófagos, Células dendríticas.....	30
1.1.4.1. Sistema monocito-macrófago	30
1.1.4.2. Células dendríticas.....	31
1.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA CELULAR.....	32
1.3. REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE	34
1.3.1. Presentación antigénica.....	34
1.3.2. Interacción linfocito B - linfocito T.....	35
1.3.3. Factores solubles.....	36
1.4. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.....	37
2. ENDOMETRIOSIS	39
2.1. CLASIFICACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS	41
2.2. PATOGENIA DE LA ENDOMETRIOSIS.....	45
2.2.1. Alteraciones inmunológicas en la endometriosis.....	47
2.2.1.1. Alteraciones en la inmunidad celular	47
2.2.1.2. Alteraciones en la inmunidad humoral.....	50
2.2.2. Alteraciones moleculares en la endometriosis	52
2.2.2.1. Baja susceptibilidad a la apoptosis espontánea.....	52
2.2.2.2. Invasión de tejidos y angiogénesis	53
2.2.2.3. Autosuficiencia en señales de crecimiento estrogénicas	54

2.2.2.4. Alteraciones en mecanismos inmunosupresores.....	56
2.3. TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS.....	57
2.3.1. Tratamiento médico	58
2.3.2. Tratamiento quirúrgico	60
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS	69
1.1. MUESTRAS DE ESTUDIO.....	72
2. DETERMINACIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-G.....	73
2.1. MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA	73
2.2. MEDIANTE TÉCNICA DE WESTERN BLOT	74
3. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS POR CITOMETRIA DE FLUJO.....	78
3.1. PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA.....	80
4. DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS IL-10 Y TGF-beta MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA.....	83
5. RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
RESULTADOS	87
1. CARACTERÍSTICAS INICIALES DE LA MUESTRA DE ESTUDIO, HALLAZGOS QUIRÚRGICOS Y SEGUIMIENTO CLÍNICO	89
1.1. CARACTERÍSTICAS INICIALES.....	89
1.2. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA, HALLAZGOS E HISTOPATOLOGÍA	90
1.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	92
2. DETERMINACIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-G.....	93
2.1. NIVELES DE HLA-G Y SU RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS INICIALES.....	93
2.2. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA SEVERIDAD Y LA FORMA DE PRESENTACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS	96
2.3. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA HISTOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS	97

2.4. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA FASE DEL CICLO MENSTRUAL DE LAS PACIENTES.....	99
2.5. DETERMINACIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-G MEDIANTE LA TÉCNICA DE WB.....	100
3. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	102
3.1. NIVELES DE CÉLULAS TREG Y SU RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS INICIALES	102
3.2. NIVELES DE CÉLULAS TREG Y SU RELACIÓN CON LA SEVERIDAD Y LA FORMA DE PRESENTACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS	105
3.3. NIVELES DE CÉLULAS TREG SEGÚN LA HISTOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS	106
3.4. NIVELES DE CÉLULAS TREG SEGÚN LA FASE DEL CICLO MENSTRUAL DE LAS PACIENTES	106
4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS IL-10 Y TGF- β	107
5. ANÁLISIS DEL RIESGO DE RECURRENCIAS	108
5.1. SEGUIMIENTO CLÍNICO Y VALORACIÓN DE RECURRENCIAS	108
5.2. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA TRAS LA INTERVENCIÓN.....	110
5.3. NIVELES DE CÉLULAS TREG SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA TRAS LA INTERVENCIÓN.....	112
5.4. ANÁLISIS DE LA TASA Y LOS RIESGOS DE RECURRENCIAS	112
DISCUSIÓN.....	119
1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	121
2. CONSIDERACIONES SOBRE LA MOLÉCULA HLA-G.....	123
3. CONSIDERACIONES SOBRE LAS CÉLULAS TREG Y CITOCINAS	128
4. CONSIDERACIONES SOBRE RECURRENCIAS.....	133
CONCLUSIONES.....	135
BIBLIOGRAFÍA.....	139



INTRODUCCIÓN





1. EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está formado por un conjunto de células morfológica y funcionalmente diferentes: linfocitos, fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos) y fagocitos polimorfonucleares (granulocitos). Estas células interactúan continuamente entre sí, bien por contacto físico célula-célula o bien mediante la secreción de diversos factores solubles que regulan el sistema inmune, así como la inflamación y las funciones de otros órganos. Dependiendo de las circunstancias y de los requerimientos necesarios en cada momento, un linfocito puede contactar con otros tipos de linfocitos y con otros tipos de células como los monocito-macrófagos o las células dendríticas (DC). Esto posibilita que el sistema inmunitario posea un alto grado de regulación interna (1).

La finalidad del sistema inmune es mantener la propia identidad, distinguiendo entre lo propio del organismo y lo ajeno al mismo. Además, es capaz de detectar aquellos componentes del organismo que han sido alterados de forma intrínseca o extrínseca (por ejemplo, infecciones virales). Para ello existe un doble mecanismo de defensa inmunológico:

- **Inmunidad inespecífica o innata**

Es la primera barrera que se encuentra un agente externo al acceder al organismo, en las primeras fases de la infección y normalmente es suficiente para eliminar al patógeno. Está constituida por la piel y mucosas, por elementos celulares fagocíticos (los monocito-macrófagos y leucocitos polimorfonucleares), y por células agresoras naturales como las natural killer (NK), así como por factores humorales como el complemento. Estos componentes no requieren tiempo de latencia entre el estímulo y el desencadenamiento de su acción. Carecen de especificidad y tampoco presentan memoria.

- **Inmunidad específica o adaptativa**

Se pone en marcha cuando el patógeno no logra ser eliminado por la inmunidad natural, produciéndose la respuesta inmune primaria. A partir de ésta se establece la memoria inmunológica específica de antígeno, que permite la eliminación más rápida y eficaz (respuesta inmune secundaria) ante un nuevo encuentro. Las

células responsables de este tipo de inmunidad, son los linfocitos B y T, que expresan receptores específicos para el antígeno. Tras el primer contacto con éste, deben transcurrir varios días, durante los cuales los linfocitos específicos que se unieron al antígeno proliferan y amplifican su número.

Existen dos tipos de inmunidad específica (figura 1):

- a) Inmunidad humoral, mediada por los linfocitos B y sus productos (anticuerpos), y que tiene como función la eliminación de antígenos extracelulares.
- b) Inmunidad celular, realizada por los linfocitos T y que actúa frente a antígenos intracelulares.

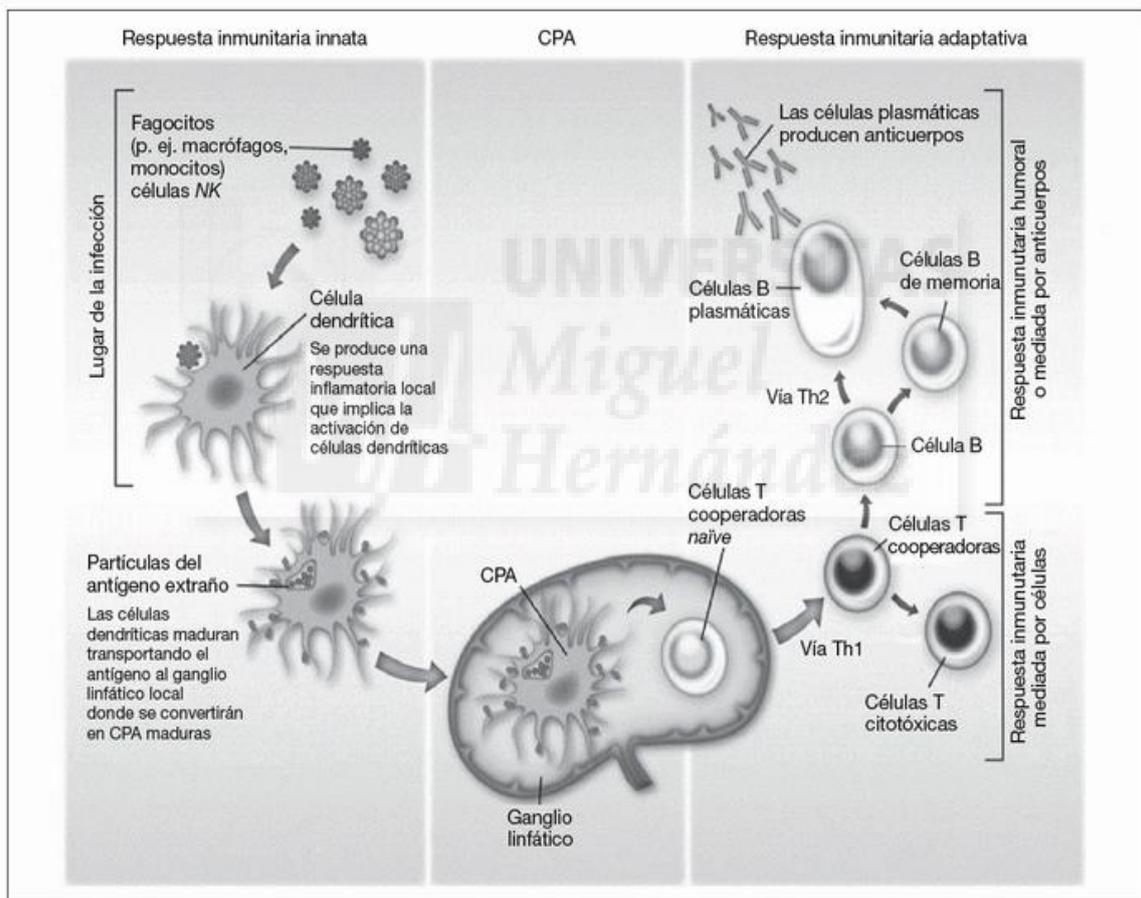


Figura 1: Bayas J.M. *Natural infection and vaccines against the HPV: role of antibodies in the long-term protection*. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. Vol.52. Num.05. Mayo 2009

Podemos dividir esta respuesta inmune en tres fases:

1. Fase de reconocimiento del antígeno por parte de linfocitos específicos, mayoritariamente tras la presentación de los determinantes antigénicos por las células presentadoras de antígeno (APC).
2. Fase de activación inducida en los linfocitos tras el contacto con el antígeno. Lleva a la proliferación de los clones de células específicas para el antígeno y a su posterior diferenciación en células efectoras.
3. Fase efectora, donde las células ya diferenciadas son capaces de eliminar o neutralizar el antígeno, con la colaboración de elementos que pertenecen a la inmunidad natural (complemento, fagocitos, etc.).

1.1. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

En el desarrollo de la respuesta inmune específica intervienen dos grupos principales de células: los linfocitos y las células del sistema monocito-macrófago. Existen tres tipos diferentes de linfocitos: linfocitos T, linfocitos B y células NK.

1.1.1. Linfocitos T

Los linfocitos T son células que se desarrollan en el timo a partir de los progenitores linfoides derivados de la célula hematopoyética pluripotencial. El papel de estas células en la respuesta inmune específica es central, ya que de ellos depende el control de su propio linaje y el de los linfocitos B, además de tener funciones directas como la citotoxicidad.

Los linfocitos T son el tipo mayoritario de linfocitos en sangre (70-80%) (2). Las moléculas de membrana que caracterizan a los linfocitos T maduros son su receptor específico para el antígeno (TCR) y la molécula CD3, que se coexpresa junto con el receptor y es importante para su funcionamiento. Los linfocitos T sólo reconocen al antígeno cuando éste es presentado por otras células (como las APC) formando un complejo con las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) de clase I o de clase II (3).

Existen dos grandes subpoblaciones de linfocitos T maduros:

- **Linfocitos T cooperadores (TH o Helper):** se caracterizan por expresar en membrana la molécula CD4. Estas células reconocen al antígeno en asociación con las moléculas HLA de clase II en la membrana de las APC. Tras el reconocimiento, los linfocitos T CD4+ promueven la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B, así como la proliferación de los propios linfocitos T CD4+ y CD8+. Algunos de estos linfocitos son inductores de células supresoras. También interactúan con monocitos y macrófagos. Estas señales de cooperación las realizan a través de moléculas de membrana que interactúan con las de las otras células, o mediante la liberación de factores solubles (citocinas) que se unen a receptores específicos presentes en las células de la mayor parte del sistema inmune y no inmune.

Tras el reconocimiento antigénico, el linfocito T comienza a proliferar y pasa por un estado intermedio de diferenciación llamado TH0. El cambio a células efectoras depende de las señales que reciba la célula TH0 cuando interactúa con el antígeno: naturaleza del patógeno, dosis y lugar de contacto con el antígeno, tipo de APC, etc.

Dentro de los linfocitos T CD4+ efectoras se distinguen tres subtipos que se diferencian en el patrón de citocinas que sintetizan, y que en el sistema inmune humano se solapan:

- o TH1: secreta interleucina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ), y coopera con macrófagos y otros linfocitos T. Este tipo de respuestas parecen desencadenarse frente a antígenos intracelulares (virus, bacterias).
- o TH2: secreta IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, y coopera con linfocitos B y eosinófilos para hacer frente a parásitos extracelulares.
- o TH3: ha sido descrito recientemente. Secreta factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Coopera con linfocitos B para la producción de inmunoglobulina tipo A (IgA), y tiene actividad supresora principalmente sobre las células TH1 y TH2 (4).

Mención especial merecen los *linfocitos T reguladores (Treg)*, una subpoblación especializada de células T CD4+. Representan aproximadamente el 5% de la población de células CD4+. Estas células inhiben el proceso inflamatorio generado por la respuesta inmune a un antígeno, una vez neutralizada la causa que la originó y, por lo tanto, contribuyen al mantenimiento de la autotolerancia inmunológica y a la homeostasis inmune. Su caracterización ha sido tema de gran debate debido a la falta de marcadores exclusivos para su identificación y separación. Los linfocitos T CD4+ expresan la molécula CD25 en distintos niveles, pero los Treg muestran los niveles más altos de este marcador. La búsqueda de nuevos marcadores para identificar a las Treg llevó a la identificación de la molécula Foxp3, un factor de transcripción de la familia *forkhead* y un regulador importante de la homeostasis de las células Treg. Sin embargo, la expresión de Foxp3 también puede ser inducida por estimulación a través del receptor de células T en las células T efectoras humanas, las cuales no tienen actividad supresora (5). Por lo tanto, la expresión de Foxp3 es necesaria para su función, pero no suficiente para identificar a las Treg.

Actualmente existe una gran diversidad de marcadores para identificar a los linfocitos Treg, lo que ha llevado a la conclusión de que dentro de este grupo podemos encontrar distintas poblaciones que regulan la respuesta inmune: células Treg naturales y células Treg inducibles (iTreg). Las Treg naturales (nTreg) poseen el fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ y tienen la capacidad de suprimir las células CD4+, las células dendríticas, las células T CD8+, las células natural killer, los monocito-macrófagos, los linfocitos B, los eosinófilos, los osteoblastos, los basófilos y los neutrófilos. Las células Treg inducibles se dividen en células reguladoras tipo 1 y en células Treg tipo TH3. Las tipo 1 se caracterizan por expresar IL-10, aunque también son capaces de expresar TGF- β , IL-2, IL-5 e IFN- γ . Las células TH3 secretan principalmente TGF- β , como ya se ha comentado antes, aunque también pueden secretar IL-10.

Los principales mecanismos de supresión de las células nTreg son a través de citocinas, citolisis, modulación del microambiente y receptores de superficie (6) (figura 2).

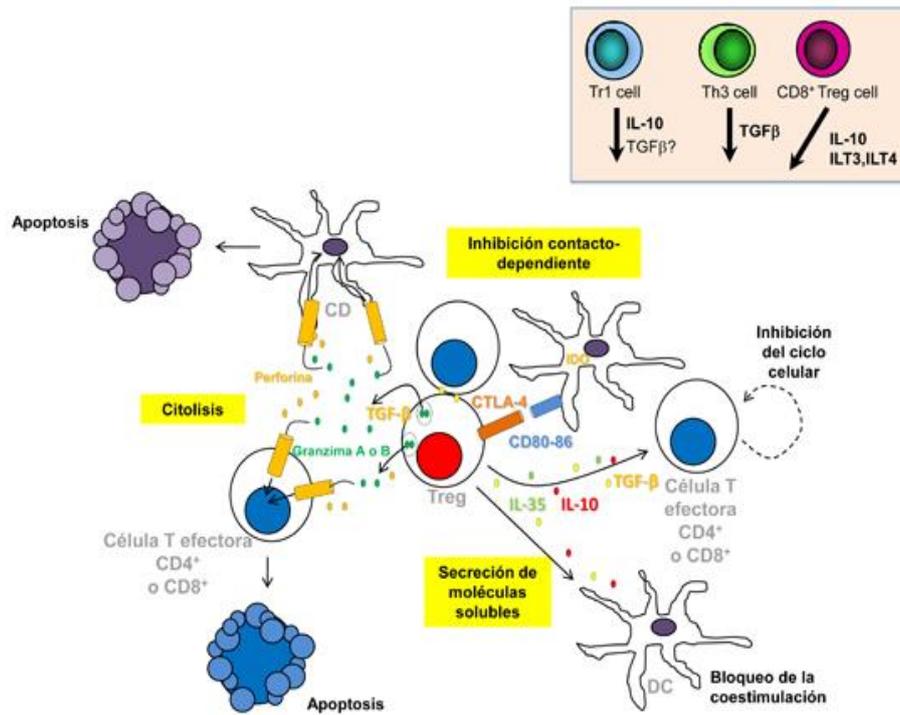


Figura 2: Mecanismo de acción de las células Treg (López, M. *Tolerancia. Trasplante al día.* Sociedad Española de Trasplante. Oct 2013).

- Linfocitos T citotóxicos/supresores (Tc):** se caracterizan por expresar la molécula de membrana CD8. Reconocen al antígeno en asociación con las moléculas HLA de clase I que expresan las células diana (células infectadas por virus, células tumorales, injertos de tejido extraño) y liberan unas proteínas llamadas perforinas que las lisan en pocos minutos. Algunos de estos linfocitos desarrollan funciones supresoras para evitar que una excesiva amplificación de la respuesta por parte de los linfocitos TH pudiera ser nociva para el propio organismo. Los linfocitos T CD8+ son dependientes de la IL-2 producida por los linfocitos T CD4+ para su proliferación y expansión. En sangre periférica los linfocitos T CD4+ predominan sobre los CD8+ en una relación aproximada de 2:1.

1.1.2. Linfocitos B

Los linfocitos B median la respuesta inmune adaptativa humoral. Son capaces de reconocer antígenos solubles y sintetizar anticuerpos específicos frente a ellos. Se

desarrollan a partir de la célula hematopoyética pluripotencial y, una vez maduros, expresan en membrana el receptor para el antígeno o complejo BCR, formado por una inmunoglobulina (Ig), que es diferente en cada linfocito B (7), y que es el componente implicado en la unión con el antígeno (8).

Una de las principales funciones de las células B es responder a antígenos, la mayoría de tipo proteico o hidrocarbonado y en su forma nativa, produciendo anticuerpos frente a ellos. Esta es una diferencia importante con los linfocitos T, que sólo reconocen fragmentos peptídicos del antígeno.

Otra función importante de los linfocitos B es actuar como APC. Cuando se produce la interacción con el antígeno, el linfocito B puede activarse. Para ello es necesario, en la mayoría de los casos, que también interaccione con un linfocito T cooperador que reconozca el mismo antígeno (9). Tras la activación, la célula B prolifera y se diferencia en célula plasmática, con capacidad de secretar anticuerpos específicos frente al antígeno reconocido. Estas Ig secretadas tienen las mismas regiones variables (zona de unión al antígeno) que las que expresaba el linfocito en la membrana antes de ser estimulado.

Existen 5 clases de Ig: M, G, A, D y E. Están formadas por 4 cadenas polipeptídicas que se ensamblan adoptando una configuración espacial en forma de Y.

Las inmunoglobulinas desempeñan dos tipos de funciones:

- 1) La capacidad de unirse específicamente con el antígeno, función que las define y que reside en el fragmento Fab (fragmento que se corresponde con los brazos superiores de la Y)
- 2) La capacidad de desencadenar ciertas funciones efectoras, radicadas en el fragmento Fc.

La Ig M es la predominante en la fase primaria de la respuesta inmunitaria de anticuerpo. La Ig G predomina en el suero y en el espacio extravascular. Difunde muy bien a través de las membranas y es también la que predomina en las secreciones internas, siendo la única que atraviesa la placenta. Es la predominante en la fase secundaria de la respuesta inmune.

1.1.3. Células Natural Killer

Las células agresoras naturales o NK constituyen un grupo con gran importancia en la respuesta inmune innata que contribuye a la defensa frente a células infectadas por virus, bacterias, hongos y parásitos. La principal actividad de la célula NK es su capacidad de actuar frente al crecimiento de células tumorales impidiendo su expansión y la formación de metástasis. Estas células son responsables de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, es decir, destruyen células con antígenos extraños en su superficie frente a los que se han producido anticuerpos.

Las células NK tienen la capacidad de lisar determinadas células diana por un mecanismo de contacto célula-célula, sin ser inducidas por antígenos específicos ni restricción por el HLA. Estos linfocitos actúan sobre células que no expresan moléculas HLA, ya que las células que expresan HLA-G las inhiben (10). Las células NK también poseen un receptor de afinidad intermedia para IL-2, por lo que en presencia de concentraciones suficientemente altas de IL-2 proliferan y adquieren actividad citolítica.

1.1.4. Células Presentadoras de antígeno: Monocito-macrófagos, Células dendríticas.

La activación de los linfocitos T CD4+ requiere la presencia de monocitos u otras APC que procesen y presenten el antígeno en asociación con las moléculas del sistema HLA de clase II. Estas APC proporcionan señales estimulantes a los linfocitos T, bien mediante citocinas como IL-1, IL-6 o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o bien por el contacto físico entre el linfocito T y el monocito. Los antígenos nativos, como las proteínas, antes de ser presentados son degradados intracelularmente por las APC para obtener fragmentos peptídicos adecuados que puedan unirse a las moléculas HLA.

1.1.4.1. Sistema monocito-macrófago

Estas células constituyen el sistema fagocítico mononuclear y forman parte del sistema inmune natural o innato. Los promonocitos al madurar salen de la médula

ósea, diferenciándose en monocitos circulantes, que al cabo de unas horas emigran a distintos tejidos, donde se convierten en macrófagos. Estas células presentan actividad fagocítica y productora de citocinas. Los fagocitos endocitan partículas extrañas (microorganismos y macromoléculas), células propias lesionadas o muertas y restos celulares. El fagocito se ve atraído por quimiotaxis, se adhiere por receptores a la partícula extraña, con lo que se activa la membrana del fagocito, creando una vesícula membranosa que engloba al antígeno dentro de la cual se destruye por mecanismos microbicidas y enzimas hidrolíticas.

Los macrófagos, tras su activación, producen citocinas que atraen a otras células, y que son responsables de muchos de los efectos sistémicos de la inflamación. También producen factores estimuladores de fibroblastos y células endoteliales, que promueven la reparación de los tejidos dañados.

Los fagocitos, además de intervenir en la respuesta natural, actúan como células accesorias en la respuesta inmune específica:

1. Como APC: El antígeno endocitado no se degrada totalmente, sino en péptidos que se asocian dentro del endosoma con moléculas HLA-II. Los complejos HLA-II + péptido son expuestos en la superficie del macrófago, donde son reconocidos por los linfocitos T CD4+ específicos cuyo TCR sea complementario (11).
2. Los macrófagos son activados por citocinas secretadas por los linfocitos TH activados tras su contacto con las APC. Los macrófagos así mejoran su capacidad fagocítica y destructiva, actuando como células efectoras de la inmunidad celular.
3. Los macrófagos activados son a menudo los efectores finales de las respuestas humorales. Éste frente al antígeno lleva a cabo sus funciones fagocítica y citotóxica. Por ello, el macrófago es frecuentemente el encargado final de la eliminación del microorganismo en la respuesta humoral de la inmunidad.

1.1.4.2. Células dendríticas

Las DC juegan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune, siendo las células presentadoras de antígeno más potentes y estimuladoras de las células T. También son importantes en el mantenimiento de la tolerancia frente a los antígenos del propio organismo. En los últimos años su estudio ha cobrado un enorme

interés por su posible uso terapéutico en la inmunización activa frente a tumores y agentes infecciosos establecidos, así como, paradójicamente, para el tratamiento de fenómenos autoinmunes en un intento de restablecer la tolerancia inmunitaria específica frente a los autoantígenos. Este tipo de APC no presenta una actividad fagocítica importante y se desconoce si puede endocitar el antígeno para degradarlo, por lo que se plantea la posibilidad de que pueda hacerlo mediante enzimas proteolíticas asociadas a sus membranas.

Existen dos tipos de DC, con funciones y propiedades diferentes:

- *Las DC interdigitantes* tienen origen mieloide y derivan de los fagocitos mononucleares. Están presentes en los intersticios de la mayor parte de los órganos y son las APC más potentes y altamente especializadas en capturar antígenos e inducir respuestas inmunes adaptativas, restringidas por HLA-II. El prototipo es la célula de Langerhans de la piel. Cuando entran en contacto con un antígeno, lo capturan y transportan por los vasos linfáticos aferentes hasta llegar a la paracorteza de los ganglios linfáticos regionales, donde se convierten en APC profesionales. Allí presentan el antígeno a los linfocitos TH para que se inicie la respuesta inmune.
- *Las DC foliculares* no derivan de la médula ósea, y no parece que tengan que ver con las anteriores. Presentan gran cantidad de receptores para el complemento y para las Ig G que les permiten atrapar complejos antígeno-anticuerpo o antígeno-complemento y presentarlos a los linfocitos B. Están presentes en los ganglios, el bazo y los folículos linfoides asociados a mucosas, y parece que son esenciales en el desarrollo de las células B de memoria.

1.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA CELULAR

Las células del sistema inmune realizan sus diferentes funciones a través del contacto célula-célula, mediante una serie de receptores o antígenos de membrana que se expresan en gran número en la superficie celular. Algunas de estas moléculas aparecen en determinados estadios de diferenciación o en la activación celular, durante breves períodos de tiempo. Otras son características de determinadas líneas celulares.

Desde el momento en que se diferenciaron clases de linfocitos con una función y desarrollo distinto, se intentaron desarrollar métodos para identificarlos. La obtención de anticuerpos monoclonales que reconocieran de forma selectiva y específica distintas subpoblaciones linfocitarias facilitó esta tarea. A las moléculas de superficie celular reconocidas por estos anticuerpos se les llama *antígenos de diferenciación* o marcadores. Se adoptó un sistema de clasificación según el cual a un marcador de superficie que identifique una estirpe o un estadio de diferenciación determinado, que tiene una estructura definida y que es reconocido por un grupo de anticuerpos monoclonales, se le denomina grupo de diferenciación (Cluster of differentiation, CD) (12). De este modo, todos los antígenos de superficie de estructura definida son denominados CD seguido de un número que es arbitrario y no sigue un criterio definido.

Por ejemplo, los antígenos de diferenciación CD4 y CD8 son glucoproteínas de la superficie de los linfocitos T y permiten distinguir entre las subpoblaciones cooperadora (TH) y citotóxica (Tc). Los primeros se caracterizan por presentar un fenotipo CD4+CD8-; los segundos son CD4-CD8+. Ambas moléculas favorecen la activación de los linfocitos T, iniciada por la unión TCR-antígeno-HLA (13). Estos marcadores sirven como moléculas de adhesión debido a su afinidad específica por el HLA, estabilizando la unión entre las células (13).

Los leucocitos, fundamentalmente los linfocitos T, sufren importantes cambios en los antígenos de membrana tras la estimulación inmune. Una de las moléculas de activación más importantes es CD25 y se expresa en linfocitos T activados, macrófagos, células B y células NK. Es un receptor de baja afinidad para la IL-2 e induce la activación y proliferación de las mismas células que lo expresan.

Otra molécula importante en la activación celular es el CD80, que se expresa principalmente en las APC capaces de estimular a linfocitos T. Es una molécula coestimuladora que se expresa junto con el HLA-II, por lo que la expresión de ambas indica la capacidad de presentación antigénica. El ligando de CD80 es la molécula CD28 expresada por el linfocito T y su interacción es fundamental para la activación del linfocito tras la presentación antigénica. Esta unión aumenta la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T coadyuvantes. CD80 también se expresa en linfocitos CD4+ y CD8+ activados, apareciendo tarde tras la activación, por lo que estas células podrían ser capaces de llevar a cabo una coestimulación autocrina vía CD28 (14).

La adhesión específica entre diferentes células o entre células y matrices extracelulares es un componente esencial de la migración y el reconocimiento celular. Los antígenos de membrana responsables de estos tipos de interacción son las llamadas moléculas de adhesión (integrinas). Son las encargadas de la interacción que se establece entre las células del torrente sanguíneo y las células endoteliales y por lo tanto ejercen un papel clave tanto en fenómenos normales como patológicos (inflamación, trombosis, metástasis de células tumorales). Algunas de ellas están implicadas en el reconocimiento e interacciones con otras células. La integrina beta 1 (CD29) es un marcador de activación tardío y es la subunidad común en todas las integrinas. En sangre periférica, el CD29 se expresa en linfocitos T CD4+ (principalmente en células de memoria) y CD8+, y en algunos linfocitos B (15).

1.3. REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

1.3.1. Presentación antigénica.

La respuesta inmune específica comienza siempre con la presentación del antígeno a los linfocitos T en ganglios linfáticos y otros órganos por parte de las APC, que lo procesan y expresan en su superficie celular mediante el sistema HLA, clave en la distinción entre lo propio y lo no propio (16). Este sistema está codificado por dos tipos de genes. Las moléculas de clase I se expresan en todas las células del organismo, excepto en hematíes. Las moléculas de clase II se expresan en células del sistema inmune, sobre todo linfocitos B y sistema monocito-macrófago, principales APC. Ambos tipos de moléculas unen péptidos antigénicos.

Los que se unen a HLA-I son proteínas que proceden del citosol (las sintetiza la propia célula o bien son antígenos virales procesados como propios). En cambio, los que se unen a HLA-II suelen proceder de proteínas exógenas, generalmente de patógenos fagocitados o endocitados. Según el tipo de molécula HLA de clase I ó II, intervendrá el subtipo de linfocito T CD8+ o CD4+, respectivamente (3).

Para que el linfocito T se active son necesarias dos señales: la interacción entre el TCR y el péptido antigénico asociado a HLA en la superficie de la APC (17), y la señal coestimuladora mediante la molécula CD80 de la APC y el CD28 del linfocito

T. Estas interacciones producen la activación, proliferación y diferenciación del linfocito T a una función efectora determinada (cooperadora o citotóxica).

Los linfocitos TH son necesarios para activar las principales células efectoras (linfocitos Tc, linfocitos B, células NK, macrófagos), por lo que se activan pronto durante la respuesta inmune. Estas células necesitan dos señales de activación:

1. Unión del TCR con el complejo antígeno-HLA-II de la APC (sistema monocito-macrófago) (18).
2. IL-1, citocina liberada por la APC activada, cuya función principal es iniciar la respuesta inmune.

Estas dos señales inducen en los linfocitos T la expresión de receptores para IL-2 y la producción de la propia IL-2 (19). Esta citocina amplifica la respuesta iniciada por el linfocito al contactar con la APC, induciendo el crecimiento y activación de las células que expresan su receptor (linfocitos Tc, células NK, macrófagos y los propios linfocitos TH), que producen a su vez otras citocinas que ejercen diferentes funciones.

Los linfocitos Tc también necesitan dos señales para su activación: la interacción del TCR con el complejo antígeno-HLA I presente en las células diana (20,21) y la IL-2 producida por los linfocitos T CD4+ activados por el antígeno (19). Tras activarse, el linfocito Tc libera citotoxinas que eliminan la célula diana.

1.3.2. Interacción linfocito B - linfocito T

La respuesta inmunitaria humoral está mediada por anticuerpos, que son producidos por las células B. Su función es neutralizar y eliminar al antígeno que indujo su formación. Cuando el linfocito B interactúa con éste, la célula se activa y se producen una serie de cambios que lleva a la proliferación y diferenciación de ese clon de células B, capaces de responder al antígeno (22).

Las células B que no se han expuesto previamente al antígeno (en reposo) necesitan dos tipos de señales o estímulos para su activación, proliferación y diferenciación: contacto del antígeno con las Ig de membrana situadas sobre las células B específicas (7), e interacción con linfocitos T CD4+ y las citocinas que secretan (23). La unión del antígeno a la Ig de membrana estimula vías de segundos mensajeros intracelulares que hacen que la célula B en reposo entre en ciclo celular y

que a la vez se prepare para interactuar y responder a los linfocitos T CD4+ (aumento en la expresión de HLA-II, receptores para citocinas, etc.). Además, la célula B internaliza y procesa los antígenos, cuyos fragmentos peptídicos son presentados a linfocitos TH específicos, ya activados por otras APC (macrófagos, DC) que presentan el mismo antígeno.

Los linfocitos T CD4+ activados que reconocen los antígenos presentados por los linfocitos B producen dos tipos de estímulos que originan la proliferación y diferenciación de las células B (22). Estos estímulos se producen por contacto físico entre las células y a través de los receptores para las citocinas secretadas por los linfocitos T. La principal molécula implicada en la estimulación del linfocito B mediante el contacto celular es el CD40 de la célula B y su ligando complementario en las células TH1 (gp39 o CD40L) (24). Esta interacción inicia la proliferación de la célula B, y las citocinas producidas por linfocitos T estimulan las posteriores respuestas del linfocito B. En cuanto a la diferenciación, las células B pueden transformarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos (siempre secretan el mismo tipo de anticuerpo) o en células de memoria. La diferenciación hacia célula de memoria depende de las señales recibidas por el linfocito B a través del CD40 desde su ligando en los linfocitos T CD4+. Esta diferenciación induce el *switch* o cambio de isotipo de Ig, especialmente tras el primer contacto con el antígeno específico.

1.3.3. Factores solubles

Las citocinas son glucoproteínas producidas en los primeros momentos de la activación celular que alertan a las células que poseen receptores específicos para ellas, de que hay una respuesta inmune en marcha, controlando su actividad y función celular (25-28). Se caracterizan por sintetizarse de novo y ser de vida media muy limitada.

Los principales productores de estas proteínas son los macrófagos y los linfocitos T, ya que actúan como principales reguladores de la respuesta inmune innata y específica, respectivamente.

Las citocinas forman parte de una red o sistema funcional, con interconexiones en cascadas y circuitos de retroalimentación positivos o negativos (29,30). Algunas son mediadores de la inmunidad innata y la inflamación. La unión del patógeno con los

macrófagos y los mastocitos provoca la síntesis de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α . El TNF- α es el principal iniciador de la respuesta inflamatoria ya que, entre otras funciones, actúa sobre los vasos sanguíneos de la zona infectada, induciendo la expresión de moléculas de adhesión al endotelio para facilitar la unión de los leucocitos circulantes. Una de las funciones principales de IL-1, IL-6 e IL-12 es el inicio de la respuesta de la fase aguda, aunque también son activadores de linfocitos T, linfocitos B y células NK.

Otras citocinas son mediadores de la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B. La diferenciación de los linfocitos T a linfocitos TH1 es inducida sobre todo por IL-12, y dichas células activan macrófagos y linfocitos TCD8+. La diferenciación a TH2 es inducida por IL-4 e IL-10, y activan linfocitos B y eosinófilos. Las citocinas que contribuyen a la proliferación de las células B son IL-2, 4 y 5, mientras que IL-6 es un factor de crecimiento para células B secretoras ya diferenciadas (31).

Hay citocinas que reciben el nombre de factores estimulantes de colonias (GM-CSF, IL-3, IL-7) cuya función principal es estimular la hematopoyesis.

Las citocinas, por tanto, desempeñan un papel clave en la duración e intensidad de la respuesta inmune y de la inflamación local y sistémica. Como consecuencia, tienen grandes implicaciones fisiopatológicas en las enfermedades con trastornos de la respuesta inmune e inflamatoria, así como un enorme potencial terapéutico, por lo que son objeto de gran interés e investigación en la actualidad.

1.4. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Un aspecto importante y crítico de la respuesta inmune es que reconoce como extraños a antígenos propios y células autólogas cuando están localizadas en sitios ectópicos. En este caso se desencadena una respuesta autoinmune que actúa como control del crecimiento descontrolado de tejido propio o aberrante en localizaciones ectópicas.

La tolerancia inmunológica es definida como la ausencia específica de respuesta del sistema inmune frente a un antígeno, ya sea propio (autoantígeno) o extraño, inducida por el contacto previo con dicho antígeno. El aspecto más importante de la tolerancia es la autotolerancia, que impide que el organismo desencadene una

respuesta inmune contra sus propios tejidos. Si falla este control se producen los fenómenos autoinmunes (32). La tolerancia a los antígenos propios parece que ocurre durante el proceso de embriogénesis a través de la selección tímica (33).

Algunos de los mecanismos por los cuales se establece y mantiene la tolerancia son:

- La exclusión de un clon celular específico o delección clonal (33).
- Anergia clonal (34): algunos clones autorreactivos no son eliminados sino que quedan en estado funcionalmente silente, incapaces de responder a un estímulo.
- El fallo de la activación celular debido a la pérdida del co-estimulador requerido para su acción.
- La supresión activa de las células autorreactivas, que pueden ser físicamente eliminadas o bien inactivadas funcionalmente (35).

Hay determinadas circunstancias en las que la tolerancia inmunológica no puede ser mantenida, como por ejemplo clones de células T que reaccionan contra antígenos extraños (proteínas virales, células tumorales) que tienen reacciones cruzadas con antígenos propios; o la exposición al sistema inmune de antígenos no accesibles (cristalino, sistema nervioso central, tiroides), anatómicamente distanciados en el desarrollo embrionario o aislados del sistema inmune; o la expresión de HLA-II en tejidos que habitualmente no lo expresan.

En aquellos casos en los que la tolerancia se mantiene por la supresión activa de los clones autorreactivos, la pérdida de esta supresión puede resultar en fenómenos autoinmunes. Los datos obtenidos hasta el momento parecen indicar que la autoinmunidad no es una condición única sino multifactorial, ya que se requieren condicionantes genéticos, inmunológicos, hormonales y ambientales. Los fenómenos autoinmunes se caracterizan a veces por la presencia de autoanticuerpos específicos, mayoritariamente contra antígenos de la membrana celular (con la actuación posterior del complemento y de las células fagocíticas), además de por citotoxicidad celular mediada por linfocitos CD8+ y algunos CD4+, y por el acúmulo de inmunocomplejos.

En la práctica, las enfermedades autoinmunes se identifican por:

- a) La presencia de linfocitos activados o de depósitos de inmunoglobulina y complemento en un determinado órgano.
- b) La determinación del título de autoanticuerpos que aumentan o disminuyen en función de la peor o mejor evolución de la enfermedad.
- c) La existencia de linfocitos T autorreactivos.

2. ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es una de las patologías ginecológicas más frecuentes, se calcula que afecta a un 5-10% de las mujeres premenopáusicas (36). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de estroma y glándulas de endometrio funcional dispuesto en forma de islotes heterotópicos, localizados ectópicamente, generalmente en la pelvis menor, y especialmente en el ovario y fondo de saco de Douglas (37-39). Localizaciones menos frecuentes son el tracto digestivo, cérvix, vagina, trompas de Falopio, vejiga, uréteres, ganglios linfáticos pélvicos y región inguinal (40). En un orden de mayor a menor frecuencia de afectación encontramos el ovario, fondo de saco de Douglas, ligamentos uterosacros, plica vesico-uterina, superficie uterina, trompas, ligamento redondo y tabique recto-vaginal (que junto con los ovarios es la localización más frecuente de recurrencias y de malignizaciones).

Esta patología, en muchos casos, persiste como leve o desaparece. En otros, genera problemas importantes debido a la invasión e infiltración tisular, a la formación de endometriomas en los ovarios o a causar bloqueo pélvico adherencial con afectación de otros órganos (39), y frecuentemente recurre, siendo la tasa de recurrencia clínica mayor en mujeres de mayor edad con estadios avanzados de la enfermedad.

En cuanto a la clínica, el dolor pélvico (dismenorrea, dispareunia y otras molestias premenstruales) y la esterilidad, son los problemas más frecuentes por los que la paciente acude a la consulta. Pero no existe correlación entre la gravedad de estos síntomas y la severidad de la endometriosis.

La dismenorrea suele ser el síntoma más característico. Es una dismenorrea que aparece sobre el 2-3º día del ciclo (tardía) y progresiva. Suele ser intra o postmenstrual. Sin embargo, la intensidad de la dismenorrea no refleja la gravedad de la endometriosis.

La dispareunia profunda también es frecuente, casi todas las pacientes la padecen, siendo uno de los síntomas más específicos.

En un 30% de los casos, aproximadamente, la endometriosis se asocia a esterilidad primaria o secundaria. Parece que la esterilidad se presenta tanto en casos leves como en los severos, aunque estudios actuales ponen en duda la existencia de esterilidad en endometriosis leve.

El algia pélvica crónica es un síntoma frecuente y relacionado normalmente con presencia de endometriomas y bloqueo pélvico. Otros síntomas menos frecuentes pueden ser la menorragia, spotting premenstrual, disquecia, rectorragia o hematuria.

Los dos procesos patológicos básicos en la endometriosis, el crecimiento y la inflamación, que son responsables del dolor pélvico crónico y de la esterilidad, y que son los síntomas clave de la endometriosis, son la consecuencia de la expresión aumentada de aromatasa y estradiol (E₂) el primero y del aumento de las prostaglandinas (PGs) el segundo (alteraciones moleculares que se comentan más adelante) (figura 3).

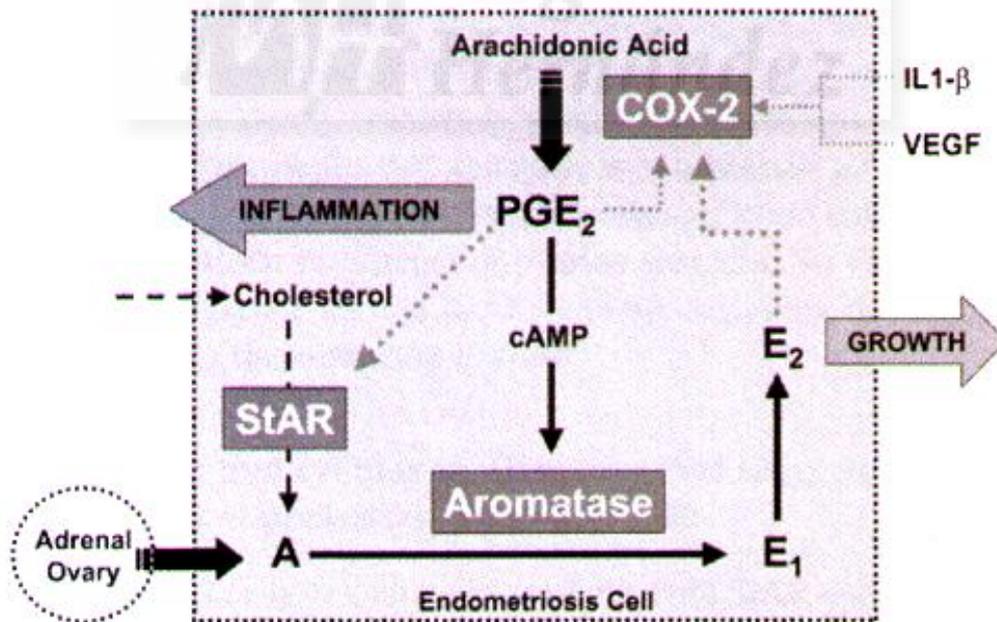


Figura 3: Attar y Bulun, Hum Reprod Update 2006;12:49-56.

Una característica básica de la endometriosis es la hormonodependencia: el endometrio ectópico responde de manera cíclica a los cambios hormonales que se producen durante el ciclo menstrual, y depende de los estrógenos para su desarrollo. Es por ello que los síntomas se intensifican en la ovulación o menstruación y que los focos se atrofian en las mujeres menopáusicas. En algunos casos, la endometriosis se reactiva en la postmenopausia, bien yatrógena o endógenamente, pudiendo ser el origen de un carcinoma endometrioide o de células claras (aunque infrecuente).

Aunque la naturaleza de la endometriosis es benigna, su comportamiento durante la madurez sexual a veces le hace parecer maligna por su progresión, por la afectación de otros órganos y por las recidivas. Sabemos también que posee otras características de malignidad como la resistencia a la apoptosis o la secreción de la molécula de histocompatibilidad HLA-G.

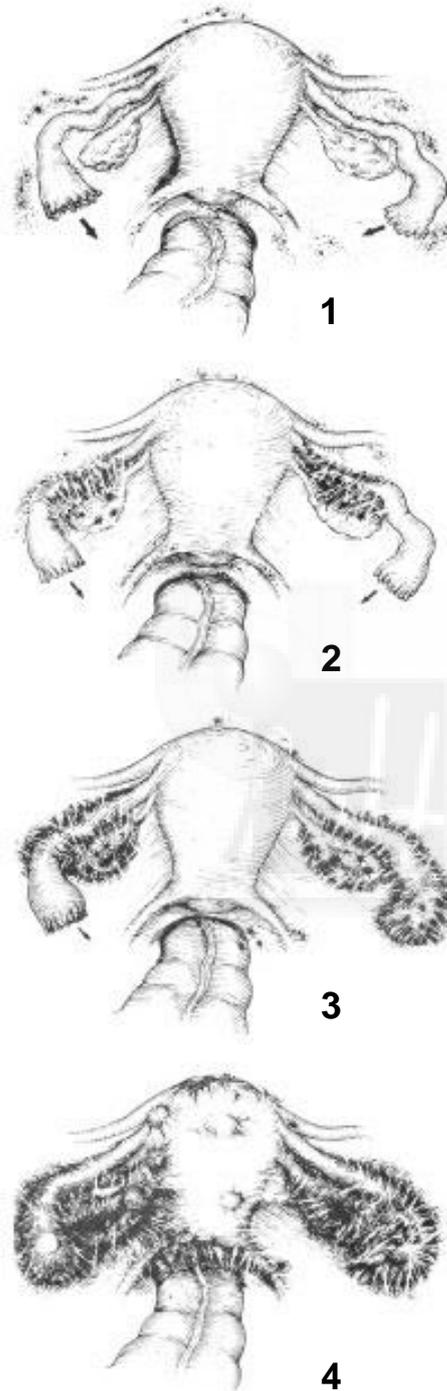
Desde hace tiempo, este complejo desorden ginecológico ha mostrado tendencias hereditarias, con un riesgo de reincidencia de un 5-7% en los familiares de la siguiente generación. Esto lo corroboran diferentes estudios que afirman que esta enfermedad constituye un desorden genético de herencia poligénica y multifactorial (36,41,42).

El diagnóstico se realiza en base a la sintomatología de la paciente, la exploración ginecológica y ecográfica, y los niveles séricos de CA-125, que se encuentra elevado en estas pacientes (> 35 U/ml), aunque la observación directa y la biopsia son el método diagnóstico gold-estándar (39, 43). *Walter et al* (2001) han insistido en la confirmación histológica de la endometriosis tras analizar la correlación entre los hallazgos visuales y anatomopatológicos. No obstante, la ecografía transvaginal (o transrectal), la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM), son técnicas no invasivas, útiles cuando los diagnósticos diferenciales son numerosos o es necesaria más información con respecto a un endometrioma conocido (44).

2.1. CLASIFICACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS

La clasificación original de la endometriosis de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) fue actualizada en 1996. Asigna puntos según la severidad de la enfermedad, basándose en el tamaño y profundidad de los implantes y

en la magnitud de las adherencias. Según estos criterios se establecen 4 estadios (figura 4):

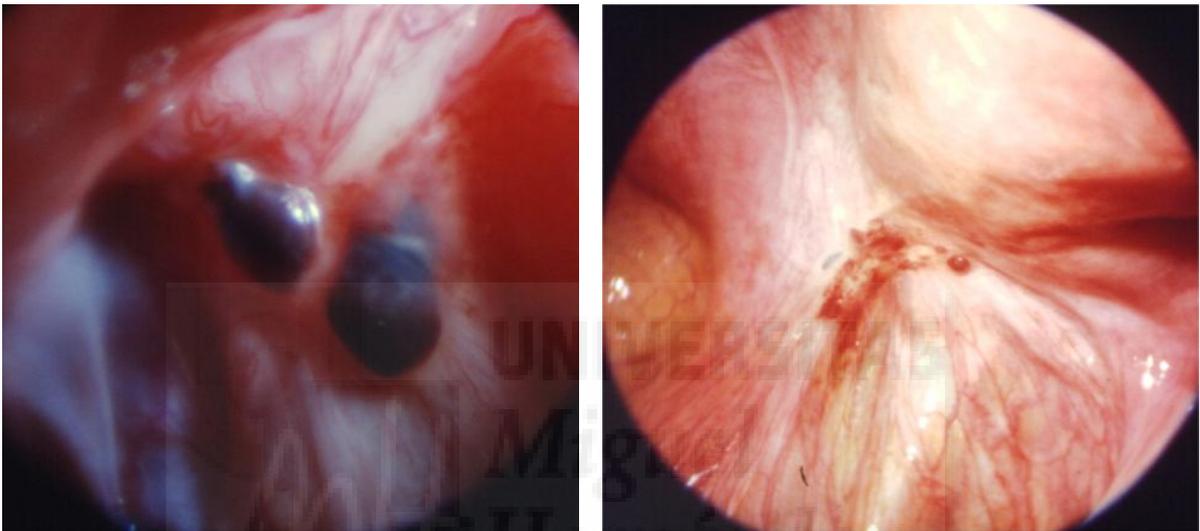


- 1) Estadio I: enfermedad mínima. Incluye la endometriosis superficial peritoneal de 1-3 cm, la endometriosis superficial ovárica <1cm unilateral y/o adherencias laxas ováricas con 1/3 de afectación del ovario implicado.
- 2) Estadio II: enfermedad leve. Incluye la afectación peritoneal profunda >3cm, afectación ovárica (puede ser bilateral) superficial <1cm y adherencias laxas que afectan <1/3 de un ovario.
- 3) Estadio III: enfermedad moderada. Incluye la afectación parcial del fondo de saco de Douglas, endometriosis ovárica uni/ bilateral de 1 a 3 cm, afectación peritoneal superficial o profunda >3cm (con presencia o no de adherencias firmes en un anejo y laxas en el contralateral, con una extensión <1/3).
- 4) Estadio IV: enfermedad severa. Engloba el bloqueo completo del Douglas, endometriosis peritoneal superficial/ profunda > 3 cm, afectación ovárica profunda uni/bilateral y adherencias firmes anexiales de 1/3 a 2/3 de extensión.

Figura 4: Grados de severidad de la endometriosis. Rodríguez, N. Cirugía ginecológica y obstétrica, 1992.

Desde el punto de vista clínico la endometriosis también se puede subdividir en tres grandes categorías según la localización anatómica y el tipo de lesiones:

- Endometriosis peritoneal superficial (figuras 5 y 6): frecuentemente leve y no suele progresar. Es la clásica lesión que está diseminada por la superficie del peritoneo, aunque en ocasiones está debajo y no puede visualizarse. Estas lesiones son las que más se corresponden con la teoría de la menstruación retrógrada de *Sampson* (43).



Figuras 5 y 6: Endometriosis peritoneal (imágenes cedidas por el Prof. Dr. Acién).

- Endometriosis quística (endometrioma) (figura 7): este término se reserva para la presencia de tejido endometrial dentro del ovario. La paciente puede presentarlo de forma única o puede asociarse a otras formas de presentación de la endometriosis, sin que esto se relacione con un mayor tamaño del endometrioma. Por tanto, se pueden encontrar endometriomas de gran tamaño en ausencia de formas peritoneales superficiales o profundas (45).

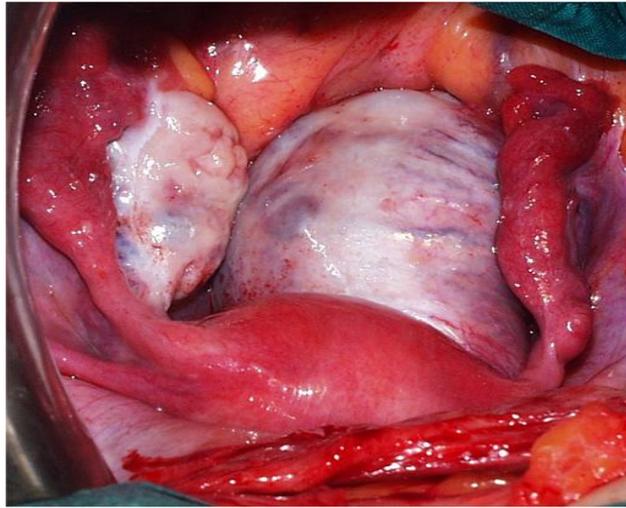


Figura 7: Endometriosis quística (Prof. Dr. Acién)

- Endometriosis infiltrante profunda (figura 8): es la forma de presentación más severa. Se ha clasificado en 3 tipos (46):
 1. **Tipo I:** Son lesiones cónicas en las que la base del cono está expuesta hacia la cavidad peritoneal. Resultan de la infiltración de una lesión superficial.
 2. **Tipo II:** cuando las lesiones están cubiertas por adherencias. Es causada por retracción.
 3. **Tipo III:** cuando la parte más extensa de la lesión está debajo de la superficie del peritoneo. Es debida a una metaplasia local de la lesión endometriósica. En este grupo se incluye la endometriosis del tabique recto-vaginal (ESRV). Otra forma de endometriosis infiltrante sería la adenomiosis.

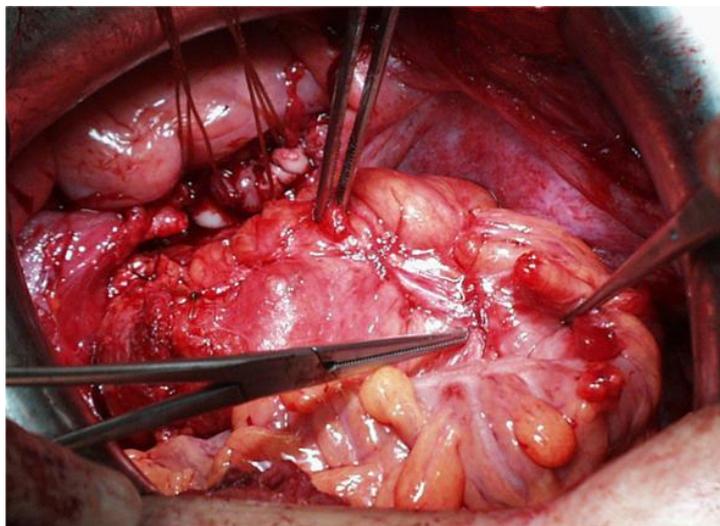


Figura 8: Endometriosis infiltrante (Prof. Dr. Acién).

Si comparamos estos tres tipos de endometriosis con la sintomatología, el marcador CA-125 y la exploración clínica, se observa una progresión en la severidad clínica y analítica de los 3 tipos de endometriosis en el mismo orden mencionado (39).

Clásicamente, en endometriosis se han reconocido dos formas: endometriosis interna (adenomiosis) y externa (localizada fuera de la cavidad uterina y miometrio). La adenomiosis consiste en la localización de tejido endometrial funcional que ha penetrado en el miometrio por extensión directa a partir del revestimiento uterino (47). Estas proyecciones digitiformes del endometrio, que crecen en profundidad y atraviesan los haces musculares de la pared uterina, pueden ser nodulares o difusas, siendo esta última la presentación más frecuente (39). Un tercio de las pacientes permanecen asintomáticas, mientras que el resto presenta cualquiera de los siguientes síntomas (47):

- Dolor pélvico progresivamente en aumento, con frecuencia asociado a la menstruación. En los casos de dismenorrea, el dolor se incrementa a lo largo de la menstruación alcanzando su pico hacia el final de la misma.
- Irregularidades menstruales, como spotting premenstrual o hipermenorrea.
- Dispareunia.
- Infertilidad.

Algunos autores emplean el término adenomiosis para la endometriosis infiltrante del fondo de saco de Douglas y para la del septo recto-vaginal, o incluso el intestino, que consiste en nódulos constituidos por glándulas endometriales con escaso estroma, rodeados por fibras musculares lisas hiperplásicas (46, 48).

2.2. PATOGENIA DE LA ENDOMETRIOSIS

A pesar de los estudios realizados, la etiología de la enfermedad no está bien establecida y es considerada como un proceso complejo y multifactorial en el que se observan numerosas alteraciones genéticas, inmunológicas, angiogénicas y endocrinas, las cuales justificarían la gran variabilidad clínica que presenta la enfermedad. El tratamiento habitual es eliminar la lesión endometriósica, bien por

cirugía o bien produciendo un ambiente hipoestrogénico, actuaciones que no corrigen las alteraciones moleculares de la enfermedad. Esto podría explicar el gran número de casos que recurren o no mejoran tras el cese del tratamiento.

Si atendemos a la fisiopatología de la endometriosis, son varias las teorías que han intentado explicar su origen (49), siendo la más aceptada la de la menstruación retrógrada con implantación a distancia, propuesta por *Sampson* en 1927 (50). Según esta teoría, fragmentos de endometrio funcional desprendidos durante la menstruación acceden retrógradamente a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad peritoneal. Posteriormente se combinan una actividad proteolítica, actividad macrófágica y actividad citotóxica de las células NK para degradar los fragmentos de tejido endometrial. Ocasionalmente, estos fragmentos de endometrio ectópico logran evadir las líneas de defensa peritoneal, probablemente por un defecto intrínseco en el sistema inmunitario (43), lo que permite la implantación del tejido endometrial. La "angiogénesis cíclica" que ocurre en el tracto reproductivo de la mujer favorecería después su supervivencia y crecimiento.

Sin embargo, el fenómeno de menstruación retrógrada sucede en el 90% de las mujeres en edad fértil, y sólo en algunos casos se llega a desarrollar la endometriosis, por lo que deben existir otros factores que favorezcan la implantación y el crecimiento de ese tejido ectópico, como la presencia de moléculas celulares que favorecen las adherencias, la capacidad de las células de invadir el tejido después de haberse adherido y la alteración de la respuesta inmunológica del organismo para eliminar esos implantes (51) (figura 9).

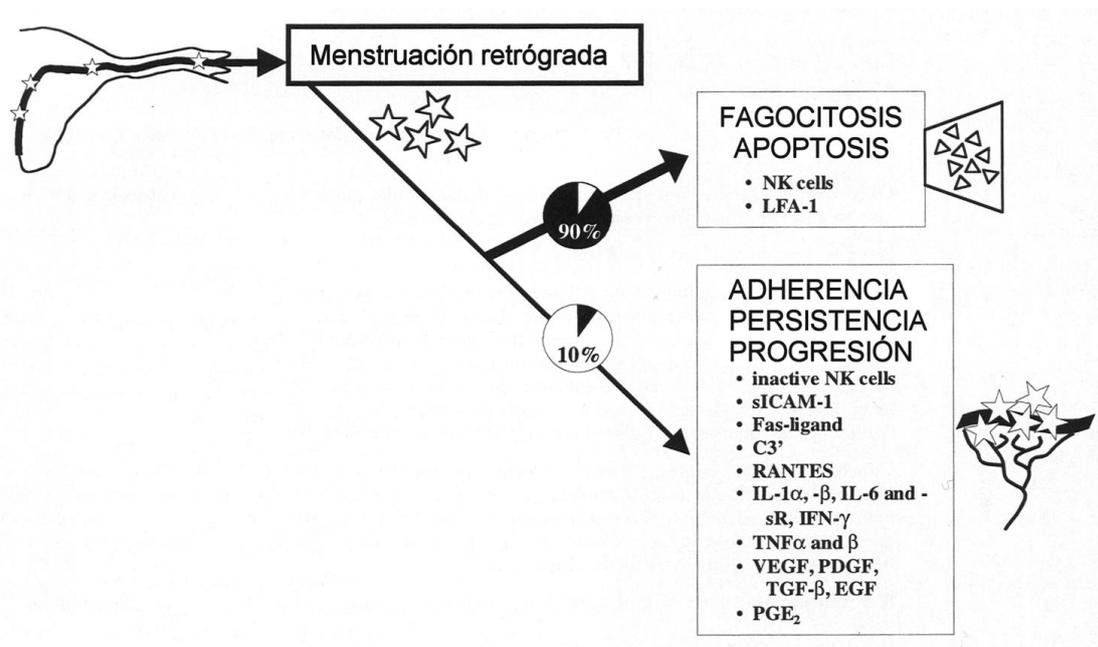


Figura 9: Lebovic et al, Fertil Steril 75:1-10, 2001.

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos en los que se relaciona la aparición de endometriosis con una disfunción del sistema inmune, incapaz de eliminar los restos de tejido endometrial ectópico. Por tanto, en estas pacientes que presentan cierta inmunotolerancia, ese tejido que no es eliminado se va acumulando con las sucesivas menstruaciones, desarrollándose así la enfermedad. Por otro lado, la aparición de endometriosis también se asocia a alteraciones moleculares propias de las células endometriales. De hecho, las células endometriales ectópicas tienen propiedades fenotípicas diferentes a las eutópicas, transformaciones que pueden ser debidas o puestas de manifiesto por la acción de factores locales presentes en el medio peritoneal.

2.2.1. Alteraciones inmunológicas en la endometriosis

2.2.1.1. Alteraciones en la inmunidad celular

Muchos estudios describen alteraciones en la inmunidad celular y en la inmunidad humoral asociadas a la presencia de endometriosis. Se desconoce aún si dichas alteraciones son causa de la enfermedad o el resultado de la inflamación

originada por la presencia de los implantes, pero si está bien determinado que favorecen su desencadenamiento y desarrollo. Se ha observado en primates un aumento de la incidencia y desarrollo de la enfermedad con la administración de tratamientos inmunosupresores (52, 53).

Fisiológicamente, la cavidad peritoneal está bañada por el líquido peritoneal (LP). Este medio dinámico contiene una gran variedad de células en suspensión como linfocitos, APC, eosinófilos y células mesoteliales (54).

Se admite generalmente que, en las fases iniciales de la endometriosis, el sistema inmune reconoce el tejido endometrial ectópico como antigénico y genera una respuesta inmune frente a él. Al ser incapaz de eliminarlo, se prolonga la respuesta que desencadena un proceso inflamatorio pélvico crónico local. De esta forma aumenta la concentración de macrófagos activados y linfocitos en el LP de estas pacientes (55), así como los productos derivados de dichas células como citocinas y factores de crecimiento que favorecen el desarrollo del implante.

Para que tenga lugar la implantación y el crecimiento de la lesión es necesaria la vascularización del tejido ectópico. El LP de mujeres con endometriosis posee actividad angiogénica (56), y en él se han detectado niveles altos de factores angiogénicos como IL-8 (56, 57), TNF- α (58, 59) y VEGF (60), que son producidos por células del estroma endometrial (61) y macrófagos peritoneales (62, 63). Todos estos factores liberados por el tejido endometriósico y células adyacentes favorecen el reclutamiento de células inflamatorias hacia el lugar de la lesión.

En mujeres con endometriosis el porcentaje de linfocitos en sangre periférica es normal, aunque el ratio de linfocitos CD4+/CD8+ está aumentado, mientras que en el LP es marcadamente más bajo (64, 65) que en mujeres sanas (54). Además, el número de linfocitos T activados (CD3+CD25+) también es más bajo, tanto en sangre como en líquido peritoneal (66). Ambos hechos sugieren que existe inactivación de la subpoblación de linfocitos CD4+, y como consecuencia una menor producción de IL-2 (67).

En ensayos que han utilizado linfocitos peritoneales y células endometriales autólogas como diana se ha observado una disminución de la lisis de éstas en pacientes con endometriosis moderada-severa respecto a controles (68, 69). En este sentido, varios estudios describen que la actividad citotóxica de las células NK está disminuida en mujeres con endometriosis, tanto en sangre como en

LP (66, 70-73), hecho que parece asociarse a la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, el porcentaje de células NK en estas pacientes no parece estar alterado (66, 68, 69). Una de las causas de este defecto funcional podría ser la presencia de determinados factores solubles, liberados por macrófagos, tanto en el suero (74, 75) como en el LP (76) de las mujeres afectadas, como se ha demostrado *in vitro*. Otra de las causas podría ser un aumento en la expresión de los receptores inhibidores de la actividad citotóxica (KIR) en la superficie de las células NK (73). La actividad del tejido endometriósico también puede afectar a la citotoxicidad, bien adquiriendo resistencia mediante la expresión de HLA-I (77), o bien secretando factores inmunosupresores que inhiban a las células citotóxicas (78).

Los macrófagos peritoneales son el tipo celular mayoritario en el LP de una pelvis normal (54), sin embargo su número y su estado de activación está aumentado en mujeres con endometriosis (79, 80). Presentan un aumento de la fagocitosis y de la secreción de factores derivados de ellos como citocinas, factores de crecimiento, enzimas y otros productos que, junto a los secretados por los linfocitos activados, podrían contribuir a la patogenia de la enfermedad (62). Sin embargo, existen estudios en los que se observa que también estas células tienen mermada su capacidad citolítica frente a las células endometriales, tanto de tejido eutópico como ectópico (81).

Existen muy pocos estudios y muy recientes en los que se valora la función de los macrófagos como APC en mujeres con endometriosis, observándose en ellas una baja capacidad de presentación antigénica debido a una disminución en la expresión de HLA-II y moléculas coestimuladoras como CD80 (82). Una vez más, algún componente del LP parece estar relacionado con este cambio (83).

Comparando el tejido endometrial ectópico con el eutópico, vemos que los focos ectópicos contienen mayor número de células CD3+CD8+ (64, 84-86), CD29+ (86), CD45+ (85), una cantidad similar de células CD4+ y macrófagos (84), y menos células NK (84, 86), respecto al eutópico. Estas diferencias pueden ser debidas a la falta de ciclicidad del tejido endometriósico.

- Niveles alterados de citocinas en endometriosis

El papel que juegan las citocinas en la endometriosis también es objeto de continua investigación. El balance de la secreción de citocinas por parte de los linfocitos TH1 y TH2 está alterado en estas pacientes (87, 88), lo que podría contribuir al descontrol funcional de las células del sistema inmune. En el suero de pacientes con endometriosis se han descrito cantidades elevadas de IL-6 (89), IL-8 (57) ó TNF- α (90), que podrían estar implicadas en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia inmunológica frente al tejido endometriósico. IL-8 y TNF- α , por ejemplo, son quimiotácticos para neutrófilos e importantes factores angiogénicos.

En el LP de pacientes con endometriosis también existen niveles altos de numerosas citocinas, entre ellas IL-1 (59, 91), IL-6 (89, 92) e IL-8 (56, 57, 87), que podrían estar implicadas en la progresión de la enfermedad y su esterilidad asociada. Nuestro grupo ha descrito que LP con altas concentraciones de citocinas, especialmente IL-6, presentan actividad embriotóxica, ya que impiden el desarrollo *in vitro* de embriones de ratón de dos células (87). Utilizando la experimentación animal, también se ha observado que el LP de estas pacientes inhibe el desarrollo embrionario (93, 94), disminuye la fecundación (95) e impide la captura del óvulo por la fimbria (96). Además, los niveles de IL-6 en el LP parecen asociarse con el dolor pélvico, así como con un menor tiempo en el que se observa recurrencia de la enfermedad (97).

Otras citocinas elevadas en el LP de mujeres con endometriosis respecto a controles sanos son IL-4 (98) y TNF α (58, 59). Por otro lado, se ha observado una disminución de IL-13, con capacidad de inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (99), e IFN- γ (67), que es sintetizado por células citotóxicas, y que puede ser debida a la inactivación de linfocitos T y células NK, como ya hemos comentado. Recientemente, se han descrito nuevas citocinas implicadas en la endometriosis como IL-15 e IL-18, ambas con función angiogénica y elevadas en el LP de estas pacientes (100, 101), así como IL-10 (65, 92).

2.2.1.2. Alteraciones en la inmunidad humoral

Aunque la menstruación retrógrada es un fenómeno muy frecuente, la endometriosis se desarrolla sólo en aquellos casos en que estos mínimos implantes progresan. Algunos autores han apuntado que la progresión de los implantes sería

debida a una rotura de la autotolerancia. Así se considera que una causa de la endometriosis sería de naturaleza autoinmune (102), en la que el implante expresaría y/o liberaría algún determinante antigénico nuevo, aunque sea en concentraciones muy bajas, que podría estar estimulando a linfocitos T y/o B, y en consecuencia inducir la producción de autoanticuerpos. Por alguna razón los antígenos presentes en el tejido endometriósico podrían ser más antigénicos que los correspondientes en el tejido endometrial eutópico (103, 104).

Muchas enfermedades de tipo autoinmune mejoran con tratamientos inmunosupresores. Sin embargo, este tipo de tratamientos realizado en primates con endometriosis favoreció la progresión de la enfermedad (53), lo que apoya la idea de que el grado de competencia inmune podría estar implicado en la aparición y/o progresión de la enfermedad.

Ya hemos comentado que los fenómenos de autoinmunidad se caracterizan por la existencia de un elevado título de autoanticuerpos y de activación del complemento. En las mujeres con endometriosis no existe hiperglobulinemia ni aumento de la actividad del complemento (105, 106). Sin embargo, existe un gran número de trabajos que describen la existencia de autoanticuerpos, aunque son difíciles de evaluar conjuntamente debido a las diferencias metodológicas. Algunos autores han detectado autoanticuerpos no específicos dirigidos contra elementos nucleares (anti-histonas) o contra elementos propios de la estructura celular (anti-cardiolipina) en pacientes con endometriosis, tanto en suero como en LP (105-107). Estos autoanticuerpos se encuentran con frecuencia en mujeres con enfermedades autoinmunes o con fallos reproductivos como esterilidad o aborto recurrente (106), por lo que podría ser también causa de esterilidad en endometriosis (108). La presencia de estos múltiples autoanticuerpos sugiere una activación policlonal de los linfocitos B.

Hay varios estudios que han analizado suero y LP de mujeres, con y sin endometriosis, observando en ellos la presencia de anticuerpos contra una gran variabilidad de antígenos endometriales (109-112). También se han detectado anticuerpos únicamente en el suero de mujeres con endometriosis (113, 114) que han sido postulados como posibles marcadores de la enfermedad (115). Los anticuerpos antiendometriales presentes en el suero de mujeres con endometriosis parecen reconocer los implantes endometriósicos a títulos altos. Sin embargo, aunque muchos autores describen autoanticuerpos contra el tejido endometrial, muy pocos lo

hacen contra tejido endometriósico (111, 116), lo que podría reflejar realmente la consecuencia de la reacción autoinmune.

2.2.2. Alteraciones moleculares en la endometriosis

Además de la ineficacia del sistema inmune, la supervivencia del tejido endometriósico también puede ser debida a alteraciones moleculares intrínsecas de las células endometriales ectópicas. Aunque esta enfermedad está considerada como benigna, posee características similares a las que presentan los procesos de malignidad como crecimiento, infiltración y metástasis. De hecho, algunas de las alteraciones moleculares que se presentan en la endometriosis son comunes a algunos tipos de cáncer como el de mama o útero. Entre estas alteraciones encontramos:

2.2.2.1. Baja susceptibilidad a la apoptosis espontánea

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo que previene la diseminación y adhesión de células diferenciadas en localizaciones inapropiadas. Este mecanismo está regulado por el gen p53, un gen supresor de tumores que tiene un papel clave en el control de la división celular, ya que es responsable de detener el ciclo celular ante la presencia de daños en el ADN. El gen p53 además de ser promotor de la apoptosis celular, activa una serie de genes pro-apoptóticos como Bax o Fas, y reprime la expresión de otros responsables de inhibir la apoptosis como Bcl-2.

Las células tumorales malignas presentan una mutación en el gen p53 que lleva a una producción defectuosa de la proteína que la hace más resistente a la degradación que la forma normal, acumulándose en el núcleo y siendo así fácilmente detectable por inmunohistoquímica, e incapaz de realizar correctamente sus funciones. Esto permite que las células tumorales sobreexpresen Bcl-2 y no sufran apoptosis, a pesar de presentar alteraciones en su material genético.

En condiciones normales, tras la aparición de menstruación retrógrada, las células endometriales regurgitadas no sobreviven en una localización ectópica gracias al

proceso de apoptosis. Sin embargo, en más del 25% de los casos de endometriosis existe un aumento de la expresión de Bcl-2, mucho mayor que la que se observa en el endometrio eutópico (117), lo que permite la supervivencia de esas células en lugares ectópicos. Pero en los casos de endometriosis normal o “benigna” no se detecta una sobreexpresión de p53. Ésta sí suele asociarse con endometriosis atípica y con áreas de endometriosis asociadas a carcinomas ováricos (118, 119). A pesar de esto, hay que tener en cuenta que algunos casos de endometriosis normal puede presentar expresión positiva de p53, por lo que es importante distinguir la endometriosis atípica reactiva o atipia inflamatoria benigna, la cual no tiene importancia clínica y es causada por la propia inflamación o por tratamientos progestágenos, de la verdadera atipia preneoplásica, diagnosticada por presencia de atipia celular y/o hiperplasia epitelial.

Probablemente debido a los factores comunes que predisponen a un proceso de malignización, las pacientes con endometriosis presentan mayor susceptibilidad de desarrollar carcinoma endometrioide ovárico y carcinoma de células claras (120). Esto está normalmente asociado a una transformación maligna de la lesión endometriósica a través de una fase de transición de endometriosis atípica. Alrededor del 60-80% de los casos de cáncer de ovario asociado a endometriosis ocurre en presencia de endometriosis atípica (el 8-10% de los casos de endometriosis ovárica) donde hemos comentado que es frecuente detectar la sobreexpresión de p53 (118).

2.2.2.2. Invasión de tejidos y angiogénesis

Las células endometriales poseen una capacidad intrínseca para la implantación que incluye su habilidad para proliferar (121), segregar factores angiogénicos (122) y digerir la superficie peritoneal produciendo metaloproteinasas (123). La síntesis de metaloproteinasas por parte de las células endometriales puede ser un hecho relevante en el proceso de invasión peritoneal (124). Estas enzimas son importantes en el remodelado de muchos tejidos ya que tienen la capacidad de fragmentar todos los componentes de la matriz extracelular. Su regulación depende en gran parte de estrógenos y progesterona (125) (figura 10).

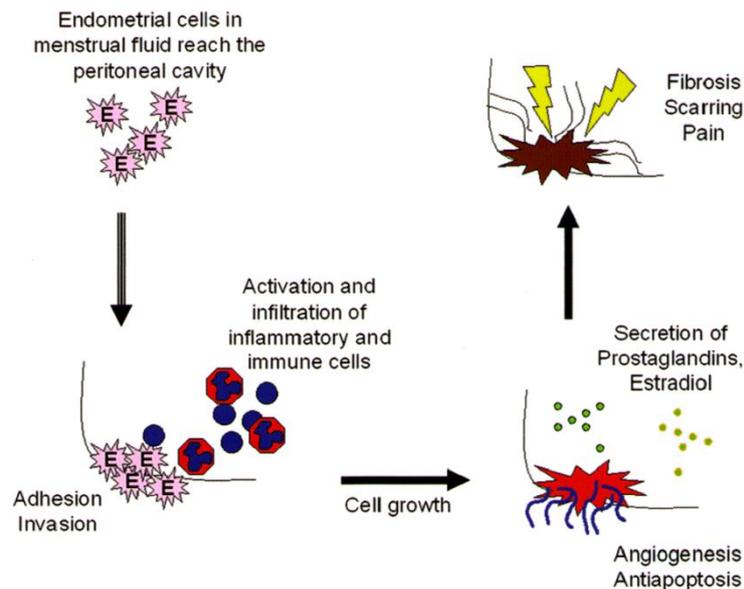


Figura 10: Flores et al, Fertil Steril, 2007.

2.2.2.3. Autosuficiencia en señales de crecimiento estrogénicas

Como ya hemos comentado, la endometriosis es un proceso hormonodependiente, es decir, el endometrio ectópico responde de manera cíclica a los cambios hormonales que se producen durante el ciclo menstrual, y depende de los estrógenos para su desarrollo. Se han identificado receptores de estrógenos y progesterona en el epitelio y estroma endometriósicos, aunque su expresión no sigue el mismo ciclo que el endometrio eutópico (126).

Una de las alteraciones moleculares más destacadas en endometriosis es la expresión aberrante del citocromo P450 aromatasa (127, 128), responsable de catalizar el paso de andrógenos a estrógenos en varios tejidos del organismo como ovarios, testículos, placenta y otros tejidos extraglandulares (la piel o el tejido adiposo). Esta enzima también está presente en el endometrio eutópico de algunas pacientes con endometriosis, aunque en cantidades muy bajas y apenas detectable (127), pero no en el endometrio de mujeres sin endometriosis (128).

El producto de la reacción que cataliza la aromatasa es estrona, un componente estrogénico débil que es transformado en estradiol por la enzima 17 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 1 (17 β HSD-1), presente también tanto en el

endometrio eutópico como en el ectópico. Sin embargo, la inactivación del estradiol en estrona sucede en el endometrio, pero no en el implante endometriósico debido a la ausencia de la isozima responsable 17β HSD-2 (129). Por tanto, la presencia de 17β HSD-1 en endometriosis es un importante complemento fisiopatológico a la expresión aberrante de aromatasa, puesto que permite una producción local de estradiol que favorece el crecimiento de los implantes (figura 11).

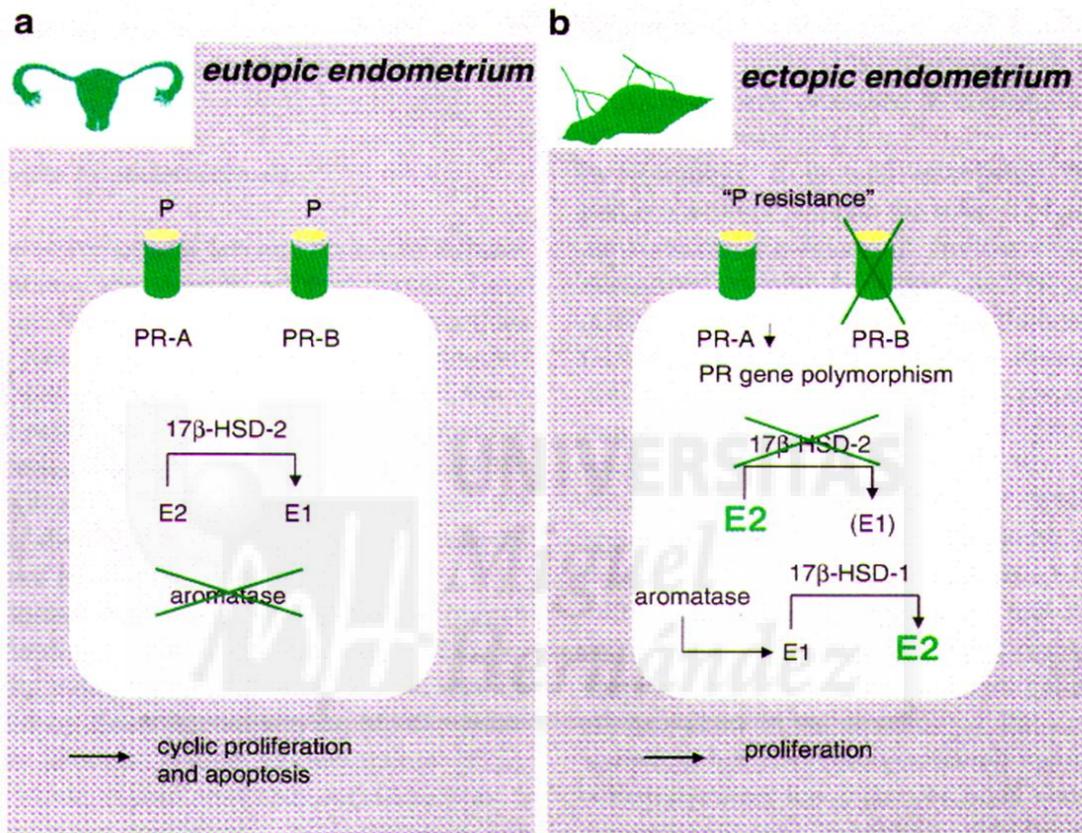


Figura 11: Tardiverdian et al. *Neuroendocrine-immune disequilibrium in endometriosis: an interdisciplinary approach*. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 193-210.

Estudios *in vitro* han mostrado que el LP de mujeres con endometriosis y las citocinas IL-6 y TNF- α aumentan la actividad aromatasa de fibroblastos derivados de tejido endometriósico (130). Estas citocinas son producidas por macrófagos y están presentes, como ya hemos comentado, en el LP de estas pacientes. Las células del endometrio eutópico y ectópico también son capaces de sintetizar y liberar algunos de estos factores (131), por lo que se trata de factores implicados en la regulación de la expresión de aromatasa en endometriosis.

2.2.2.4. Alteraciones en mecanismos inmunosupresores

Aunque la endometriosis es un proceso benigno, posee características de malignidad, como hemos comentado, tales como resistencia a la apoptosis (132), invasión de tejidos (133) o secreción de la molécula de histocompatibilidad HLA-G (134).

HLA-G es una molécula clase I no clásica del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Humano (CMH), que adopta siete isoformas, cuatro se encuentran ligadas a la membrana (G1-G4) y las otras tres formas son solubles (G5-G7). Es una molécula implicada en los mecanismos de tolerancia inmunológica debido a su efecto inhibitorio sobre las células NK, en concreto por su interacción con algunos de los receptores inhibidores presentes en estas células (KIR2DL4). Se expresa de forma selectiva en la interfase materno-fetal desempeñando un papel fundamental en la tolerancia materno-fetal (135), así como en algunos tipos de cáncer, que a través de la secreción de la molécula HLA-G escaparían a la acción anti-tumoral de los linfocitos T y las células NK, relacionándose con un peor pronóstico clínico (136, 137). Los estudios actuales van dirigidos hacia la investigación más exhaustiva de las interacciones HLA-G/NK que permiten el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en el campo del trasplante y a la inmunología de tumores.

De hecho, existen numerosos estudios en los que se describe una deficiente actividad citotóxica de las células NK en endometriosis (138), sin que eso se traduzca en una mayor incidencia de tumores o infecciones en estas pacientes. Por tanto, no parece ser una alteración intrínseca de dichas células citotóxicas, sino una inhibición de su actividad sobre los implantes endometriales ectópicos.

La detección de HLA-G en pacientes con endometriosis es controvertida. Algunos estudios no han logrado confirmar su presencia (139), mientras que otros la detectan en suero (140), LP (141) y tejido endometriósico (134). No existen trabajos sobre su determinación en el LE.

Debido a la incapacidad del sistema inmune de eliminar los implantes endometriales y a la gran respuesta inflamatoria crónica desencadenada hacia el tejido propio endometrial, muchos autores consideran la endometriosis como una enfermedad autoinmune. Unas de las células responsables de mantener la homeostasis del sistema y la tolerancia hacia autoantígenos son los linfocitos Treg, a los que se ha hecho mención anteriormente. En ausencia de estas células se

desarrollan enfermedades autoinmunes, por lo que su papel en la respuesta inmune las convierte en un blanco terapéutico muy atractivo para el tratamiento de estas enfermedades. En endometriosis hay muy pocos estudios al respecto, y apuntan a una alteración de estas células (142). Recientemente se ha demostrado la presencia de Treg en endometrio tanto eutópico como ectópico en estas pacientes (143, 144). Así mismo, se han observado niveles aumentados de mRNA del factor de transcripción de Treg-Foxp3 en lesiones endometriósicas (endometriomas) en humanos (145). Este mismo grupo detectó un aumento de la expresión de la proteína MUC1 en lesiones endometriósicas con un aumento de títulos de anticuerpos frente a esta misma proteína.

El mecanismo molecular por el cual los linfocitos Treg cumplen su función reguladora/supresora no ha sido bien caracterizado y es sujeto de intensa investigación. Algunas citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β , estarían implicadas en la función de estas células, aunque existe controversia al respecto (146).

2.3. TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS

Existen discrepancias en los resultados de tratamientos, tanto médicos como quirúrgicos, para la endometriosis. Actualmente, existen diferentes posibilidades terapéuticas que pueden aliviar el dolor y otros síntomas asociados, así como la esterilidad, pero ninguna de ellas permite una cura definitiva. Los casos de endometriosis de carácter leve, normalmente asintomáticos, se pueden llegar a resolver o permanecer estables, adoptando una conducta expectante. También administrando anticonceptivos orales (ACO) o, como alternativa, con la búsqueda de gestación, conductas que disminuirían el influjo hormonal sobre las lesiones y por lo tanto evitarían o enlentecerían su crecimiento (147). En los casos de endometriosis moderada o severa, el tratamiento requerido suele ser médico, quirúrgico o combinado (148).

Una de las características de esta patología es el comportamiento impredecible ante la conducta expectante y frente a los diferentes tratamientos.

2.3.1. Tratamiento médico

Como consecuencia de la dependencia hormonal de la endometriosis y de la existencia de receptores de estrógenos y progesterona en este tejido, los tratamientos habituales se basan en la administración de medicamentos de supresión hormonal, como son los ACO, danazol, gestrinona o análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-a), principalmente. También se han utilizado estrógenos, antiestrógenos, gestágenos (de forma continua o cíclica) y andrógenos.

Los ACO han demostrado una disminución de la sintomatología en las pacientes con dolor (149), pero no modifican de forma manifiesta la endometriosis ni solucionan la esterilidad. En pacientes sin deseo gestacional, la píldora de baja dosis (15mcg de etinil-estradiol más un gestágeno) ha demostrado buenos resultados. Se están ensayando nuevas formulaciones de ACO en las que la paciente toma de forma continua la medicación.

El danazol (inhibidor de las gonadotropinas hipofisarias con acción antiprogestogénica, antiestrogénica y androgénica) y la gestrinona (antiprogestágeno con leve acción antiestrogénica y androgénica) son fármacos de acción similar: tienen un efecto antigonadotrófico a nivel central. El danazol contribuye a la regresión de los implantes endometriósicos. Es muy eficaz en lo que se refiere a mejoría de los síntomas, siendo más útil en casos de endometriosis leve-moderada. Su administración antes de la cirugía parece mejorar los resultados de ésta. La gestrinona produce efectos parecidos a los del danazol, pero con una ventaja añadida, y es que son necesarias dosis muy inferiores a éste y es posible una administración más espaciada. Sin embargo, el período de tratamiento para ambos no debe ser muy prolongado, de 3-6 meses, ya que ambos fármacos producen un efecto androgénico.

Los GnRH-a antagonizan el efecto de esta hormona hipotalámica. Tienen una actividad biológica varias veces mayor que la nativa, por lo que muestra mayor afinidad por su receptor. Produce una inactividad ovárica y endometrial, y un estado hipoestrogénico similar a la menopausia. El período de administración es de 3-6 meses y su efecto dura varios meses post-tratamiento, mejorando significativamente la dismenorrea y la dispareunia, así como una disminución en la extensión de las lesiones (150). A nivel inmunológico, el tratamiento con GnRH-a corrige alteraciones asociadas a la endometriosis. Aumenta la población de linfocitos activados CD3+CD25+ (66), y por lo tanto la producción de IL-2, y como consecuencia se

restauran los niveles de citocinas como la disminución de IL-6 y el aumento de IFN- γ (64, 67).

Parece ser también que la utilización del implante subdérmico de etonogestrel produce una mejoría en la sintomatología endometriósica (151), al igual que el uso de DIU (dispositivo intrauterino) de levonorgestrel (152). El uso de progestágenos orales también tiene cabida en el tratamiento de la endometriosis, sobre todo en las mujeres en las que estén contraindicados los estrógenos.

Hay otros tratamientos en fase experimental: antagonistas de la GnRH, inhibidores del TNF α , mifepristona, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la matriz metaloproteinasa, agonistas de los receptores beta de estrógenos, pentoxifilina y otros inmunomoduladores, IL-2 e inhibidores de la aromatasa (asociado a agonistas de la GnRH).

Actualmente el uso clínico de IL-2 es como terapia antitumoral en carcinoma renal, donde induce la proliferación y función de linfocitos Tc (153). No existen muchos estudios que relacionen la endometriosis con IL-2, pero nuestro grupo llevó a cabo un ensayo clínico en el que se demostró que la administración de IL-2 en el interior del quiste endometriósico parece ejercer un efecto beneficioso en mujeres con endometriosis sometidas a punción-aspiración de endometriomas bajo el efecto de GnRH-a (154). En estas pacientes, la recurrencia de la enfermedad, en cuanto a síntomas, tamaño de endometrioma y niveles de CA-125, fue significativamente más tardía.

En cuanto a los inhibidores de aromatasa (Letrozol, Anastrozol, Exemestan) son fármacos ampliamente utilizados como terapia endocrina en cáncer de mama de pacientes postmenopáusicas (155). La expresión de esta enzima en endometriosis la convierte en una potencial diana terapéutica, especialmente en los casos de mayor gravedad. Recientemente se han publicado los resultados de dos ensayos clínicos en los que la combinación de inhibidores de aromatasa y GnRH-a (156) o anticonceptivos orales (149) parece mejorar los síntomas en casos de endometriosis severa, sin observarse efectos secundarios relevantes. A raíz de resultados de nuestro grupo (130), hemos puesto en marcha un ensayo clínico que pretende valorar la eficacia del anastrozol asociado a DIU de levonorgestrel en el tratamiento médico de la endometriosis moderada/severa y de sus síntomas, con o sin cirugía conservadora. En concreto se valorará la reducción o desaparición de los síntomas, de los

endometriomas y nódulos del tabique recto-vaginal y la normalización de los valores del marcador CA-125.

Sin embargo, con mucha frecuencia estos tratamientos, aunque útiles, no son suficientes para hacer frente a la enfermedad ya que, tras el cese del tratamiento, la endometriosis suele reactivarse. En estos casos se debe recurrir a la cirugía para eliminar los tejidos aberrantes.

2.3.2. Tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico de la endometriosis tiene dos finalidades: suprimir el dolor y restaurar la fertilidad. En el caso de la fertilidad, las pacientes con endometriosis mínima o leve, tienen una buena respuesta al tratamiento expectante o cirugía, en comparación con el tratamiento médico. Los casos de endometriosis moderada o severa se benefician más del tratamiento quirúrgico para aliviar el dolor, pero es más efectiva la fecundación in vitro a la hora de deseo genésico (157). A la hora de decidir el tratamiento quirúrgico también debe considerarse la posible malignización futura y las características de la paciente en cuanto a edad y deseo genésico, la duración de la esterilidad, los órganos afectados, la severidad de los síntomas y la patología pélvica asociada.

Los tipos de cirugía empleados son:

- Conservadora, mediante laparoscopia o laparotomía. Se trata de extirpar la mayor parte de tejido endometriósico (electrocoagulación/extirpación de implantes, excisión de endometriomas/ adenomiomas), intentando conservar el mayor volumen del tejido sano posible, eliminar adherencias y restituir, en lo posible, la anatomía pélvica. Incluiría otros procedimientos como la plicatura de uterosacos, neurectomía presacra o apendicectomía. Esta cirugía se realiza sobre todo en mujeres jóvenes que deseen quedar embarazadas o preservar su potencial reproductivo. En general, la cirugía conservadora suele ser eficaz para aliviar el dolor y promover la fertilidad. En endometriosis mínima/leve, desde el punto de vista de la progresión de la patología, probablemente sea beneficiosa la coagulación de los implantes, y desde el punto de vista de la esterilidad, la realización de la cromopertubación o prueba de Hinselmann y la aspiración del LP resultan beneficiosos. En este grupo incluiríamos la punción

del endometrioma, que suele realizarse vía vaginal aunque también puede realizarse vía laparoscópica o laparotómica. El drenaje del endometrioma tiene una tasa de recurrencia variable (entre el 21% y el 88%) a los 6 meses del procedimiento (158), por lo que se ha ensayado dejando IL-2 recombinante (154) o etanol (159), con mejores resultados.

- Radical, realizando una histerectomía más salpingooforectomía bilateral. Se indica en mujeres con lesiones muy severas y extensas, normalmente mayores de 40 años, con repetidas cirugías y/o deseo genésico cumplido. La extirpación de los ovarios en estas mujeres es preferible porque ha demostrado una mejoría del dolor y una disminución de recurrencias.

En resumen, en cuanto a la endometriosis mínima/leve, no se han encontrado diferencias entre la conducta expectante y el tratamiento quirúrgico, en lo que a fertilidad se refiere, pero parece razonable mantener una conducta expectante unos 6-12 meses antes de realizar un tratamiento conservador. En cualquier caso, para el tratamiento del dolor, ante el fracaso del tratamiento médico, se podría recurrir a la cirugía (o terapia combinada).

Respecto a la endometriosis moderada/severa, aunque el tratamiento quirúrgico sólo trata las secuelas (quistes, fibrosis, adherencias), suele ser necesario para el tratamiento del dolor. En cuanto a la fertilidad, suele ser necesario recurrir a técnicas de reproducción asistida.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





HIPÓTESIS DE TRABAJO

La molécula HLA-G en mujeres con endometriosis es un marcador indicativo y pronóstico de la enfermedad y está relacionada con la evolución clínica o las recurrencias en el tiempo, así como con el potencial de malignización en los casos de endometriosis atípica. Además, los niveles alterados de células T reguladoras en pacientes con endometriosis indican el grado de inmunosupresión y falta de actividad de estas células.

OBJETIVOS:

- Determinar los niveles de HLA-G soluble en suero, LP y LE o líquido de quiste (LQ) de pacientes con y sin endometriosis sometidas a cirugía conservadora/radical, así como la isoforma de HLA-G de la que se trate.
- Determinar la expresión de HLA-G en tejido endometriósico y en endometrio eutópico.
- Determinar los niveles de células T reguladoras en sangre periférica y en LP de pacientes con y sin endometriosis.
- Determinar los niveles de las citocinas IL-10 y TGF-beta en suero y LP de mujeres con y sin endometriosis, y su relación con el punto anterior.
- Analizar la relación de los datos anteriores con la sintomatología, diagnóstico clínico e histológico, grado de enfermedad, evolución clínica y riesgo de recurrencias tras la intervención.



MATERIAL Y MÉTODOS





Se ha llevado a cabo un estudio observacional prospectivo en el que se han incluido un total de 160 pacientes, vistas en las consultas de Ginecología del Hospital Clínico de San Juan entre 2010 y 2014. Del total, 120 fueron diagnosticadas de endometriosis y 30 de otro tipo de quiste anexial benigno. También se obtuvieron 10 muestras de sangre de donantes sanas, con características comparables con las pacientes a estudio.

Los sujetos de estudio se agruparon en:

- Grupo endometriosis: pacientes con endometriosis sometidas a cirugía conservadora o radical como parte del tratamiento.
- Grupo control: pacientes sin endometriosis, que por patología quística anexial diferente a la endometriosis o a cualquier alteración con dependencia hormonal, son sometidas a intervención (quistes serosos, teratomas...).

La inclusión de las pacientes en el estudio se hizo en base a los siguientes criterios:

- Mujeres en edad fértil, entre 20 y 48 años.
- Endometriosis objetivada ecográficamente (endometriomas ≥ 2.5 cm), con clínica significativa (dismenorrea, dispareunia, algia pélvica crónica) y con valores de CA-125 >35 U/ml.
- Ausencia de otra patología ginecológica o extraginecológica con dependencia hormonal.

Como criterios de exclusión consideramos: infección genital aguda, embarazo o lactancia, patología cardiovascular, patología respiratoria, alteración del estado mental, alteración hepática o renal.

1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS

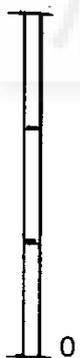
En un primer control de las pacientes, se llevó a cabo una anamnesis detallada, exploración ginecológica con ecografía transvaginal (o transrectal) y extracción de muestra sanguínea para análisis, incluyendo la determinación del marcador CA-125.

En esa misma consulta se les pasó a las pacientes una escala analógico-visual (EAV) (figura 12) que recoge la sintomatología típica de la endometriosis, para que valoraran la intensidad de los síntomas y asignarles así un valor numérico. Esta escala tiene una puntuación máxima de 10 y a partir de 4 se considera que la clínica es significativa (EAV ≥ 4). Las pacientes que lo requirieron fueron citadas de nuevo, para valorar resultados analíticos y/o repetir la ecografía en diferente fase del ciclo.

D^a
Fecha:

Etiqueta

Los síntomas más frecuentemente relacionados con la endometriosis son los que se señalan en el recuadro adjunto. Describa Vd si los padece, y la intensidad de los mismos actualmente. Haga simplemente una cruz o señal en la escala correspondiente a cada síntoma, sabiendo que 0 es la intensidad nula, y que la parte superior corresponde a la mayor intensidad que Vd consideraría para tal padecimiento:

<p>1. DISMENORREA Dismenorrea es el dolor con la menstruación. El más relacionado con la endometriosis es el dolor durante y terminando con la regla. Señale su intensidad en esta escala:</p> 	<p>2. DISPAREUNIA La dispareunia es el dolor en el fondo -profundo- al mantener relaciones sexuales, llegando a veces a imposibilitarlas. Señale su intensidad en esta escala:</p> 	<p>3. DOLOR PÉLVICO CRÓNICO El dolor pélvico crónico es el padecido, independientemente de la menstruación, en el vientre bajo y a uno o ambos lados, en la zona de los ovarios. También lo es el padecido en la parte de atrás, en la parte baja de la espalda, en los huesos de la zona lumbosacra, llegando a veces hasta el ano. Señale su intensidad en esta escala:</p> 
---	---	--

4. Subraye o envuelva con círculo si padece también otros síntomas como:

Cefaleas (dolores de cabeza)	Mareos	Malestar general
Dolores ovulatorios (a mitad de ciclo)	Disquecia (dolores con la defecación)	Dolores de espalda
Secreción mamaria	Otros:	Otros:

ESCALA ANALÓGICA VISUAL PARA LA ENDOMETRIOSIS

3-3-3-1/10. Clínica signif. si $\geq 4/10$ (P.Acién).

Figura 12: Escala analógico-visual en endometriosis

Como ya hemos comentado, todas las pacientes fueron sometidas a intervención quirúrgica conservadora o radical en el momento que se precisó. El tipo de intervención requerida lo decidió el ginecólogo en la consulta:

- Laparoscopia quirúrgica con cirugía conservadora (quistectomía anexial, fulguración de implantes endometriósicos, adherenciólisis...): pacientes con endometriomas únicos pequeños y sintomatología no muy acusada.
- Laparotomía con cirugía conservadora (acceso mediante incisión de Pfannenstiel, adherenciólisis, quistectomía anexial...): pacientes con endometriomas múltiples y sintomatología moderada/severa, así como aquellas con difícil acceso laparoscópico.
- Laparotomía con cirugía radical: incluye la histerectomía total con doble anexectomía. Este tipo de cirugía se realiza en pacientes con sintomatología severa, con cirugía/s conservadoras previas y/o con deseo genésico cumplido.

Previo a la intervención, en el mismo quirófano y antes de la inducción anestésica, se realizó una extracción sanguínea para la obtención de muestras de sangre y suero. Posteriormente, durante el acto quirúrgico, se obtuvieron muestras de LP y LE o LQ por aspiración mediante una jeringa estéril de 20 ml. En algún caso se precisó la ayuda de aguja para puncionar el quiste antes de la extirpación. Las muestras de tejido endometriósico se recogieron directamente del campo quirúrgico con pinza de disección y tijera, o de la pieza quirúrgica una vez extirpada.

Es en la intervención quirúrgica cuando se valora y estadía la endometriosis. Son cuatro los grados que identificamos: mínima (básicamente implantes peritoneales y ováricos con presencia o no de adherencias laxa), leve (implantes peritoneales con adherencias laxas y mayor afectación ovárica), moderada (adherencias firmes que afectan a parte de la pelvis con presencia o no de adherencias laxas y/o de afectación ovárica de 1 a 3 cm) y severa (bloqueo pélvico completo y afectación ovárica importante).

Así mismo, en la intervención clasificamos la endometriosis en:

- Endometriosis peritoneal: predomina el componente peritoneal (implantes/adherencias laxas).

- Endometriosis quística: predomina el componente quístico (endometrioma).
- Endometriosis infiltrante: predomina la afectación más profunda de los tejidos.

Una vez procesadas las muestras por el Servicio de Anatomía Patológica, diferenciamos los tipos histológicos siguientes: endometriosis típica (no se objetiva atipia celular) y endometriosis atípica (endometriosis que presenta atipia celular, así como expresión de la proteína p53, y se localiza tanto en quistes como en implantes).

Tras la intervención, se realizó un seguimiento de todas las pacientes, que volvieron a revisión a consulta entre los 3-6 meses (control 1) y entre los 9-12 meses post-intervención (control 2) donde se valoraron de nuevo clínica, ecográfica y analíticamente. De esta manera se pudo determinar si la paciente presentaba o no recidiva, y si necesitaba de nuevo cirugía o no. Se valoró de nuevo la aparición de sintomatología (EAV ≥ 4), de endometriomas ($\geq 2,5$ cm) y de niveles de CA-125 (≥ 35 U/ml). Se consideró endometriosis recurrente cuando se reactivaron al menos 2 de estos parámetros y se tuvo en cuenta el tiempo en el que esto se observa, considerándolo como recurrencia global.

1.1. MUESTRAS DE ESTUDIO

Las muestras recogidas en el quirófano para su análisis en el estudio fueron suero, sangre, LP, LE/LQ, endometrio eutópico (en las pacientes sometidas a histerectomía) y tejido endometriósico si lo hubiera. Tras su recogida, las muestras se trasladaron al laboratorio de investigación para ser procesadas y almacenadas según el análisis a realizar (al igual que las muestras obtenidas de sangre y suero de donantes sanas).

La biopsia de endometrio eutópico y tejido endometriósico se recogió en un tubo eppendorf seco identificado previamente y se almacenó a -30°C hasta su análisis.

La extracción sanguínea se recogió en un tubo BD Vacutainer con EDTA y un tubo BD Vacutainer con gel para la separación del suero. El tubo EDTA se reservó a 4°C para el marcaje de células T reguladoras y su análisis por citometría de flujo. Las

muestras de LP y LE/LQ recogidas en jeringa se pasaron a tubos cónicos de 11 ml para ser centrifugados, junto con el tubo de suero, a 1500 g durante 15 minutos.

Tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante de los tres tipo de muestras y se alicuotó en tubos eppendorf de 1 ml identificados previamente, para ser almacenados a -20°C hasta su análisis. El pellet obtenido del LP se reservó a 4°C para el marcaje de células T reguladoras y su análisis por citometría de flujo.

2. DETERMINACIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-G

2.1. MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA

Para determinar la concentración de la molécula HLA-G soluble en suero, LP y LE/LQ se utilizó el kit ELISA tipo sandwich de Exbio (BioVendor, Research and Diagnostic Products, Praga, República Checa), para 96 tests. Este kit detecta las isoformas solubles más abundantes, HLA-G1 y HLA-G5, y su límite de detección es de 0.6 U/ml.

Brevemente, y según las indicaciones del producto, el protocolo seguido fue el siguiente:

1. Preparar los buffers y el patrón de calibración con los diluyentes indicados.
2. Diluir las muestras problema 1:4 (30 µl de muestra en 90 µl de diluyente).
3. Pipetear por duplicado 100 µl de los calibradores (pocillos A1-A2 hasta H1-H2) y las muestras diluidas en la placa de 96 pocillos.
4. Incubar a 2-8°C durante 16-20 horas.
5. Lavar la placa 5 veces con la solución "Wash buffer" utilizando un lavador automático.
6. Añadir a toda la placa 100 µl de la solución Conjugado (anticuerpo monoclonal anti-HLA-G humano unido a peroxidada -HRP-).
7. Incubar 1 hora a temperatura (Tª) ambiente en agitación.
8. Lavar la placa 5 veces.

9. Añadir a toda la placa 100 μ l de la solución Sustrato (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina -TMB-).
10. Incubar 25 minutos a T^a ambiente en oscuridad, durante la cual los pocillos desarrollan un color azul.
11. Añadir a toda la placa 100 μ l de la solución de parada (ácido sulfúrico), tras lo cual los pocillos viran a color amarillo.
12. Determinar la absorbancia con un espectrofotómetro a 450 nm en los 5-10 minutos siguientes.

Para calcular la concentración de las muestras, se construyó la curva patrón representando mediante escala logarítmica (y posterior ajuste a escala lineal) los datos de absorbancia obtenidos de los calibradores (eje Y) frente a los valores de concentración conocida de dichos calibradores (eje X). Estas concentraciones fueron 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 y 3.9 U/ml. La ecuación correspondiente a esa curva patrón permitió calcular los datos de concentración de las muestras problema, que multiplicaron por el factor de dilución y cuyo valor final se expresa en U/ml.

2.2. MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

La detección de la molécula HLA-G en suero, LP y tejido endometriósico se realizó por la técnica de Western Blot (WB).

El WB, o inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular). Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Luego son transferidas a una membrana adsorbente (normalmente de nitrocelulosa o nylon) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. En este caso, se utilizó el anticuerpo monoclonal Antibody IgG to HLA-G Purified Antibody, clon MEM-G/1 y clon MEM-G/9, de Exbio, que detecta las isoformas HLA-G1 y HLA-G5. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras

proteínas. Como control positivo, se utilizó el sobrenadante de cultivo de la línea tumoral JEG-3 que libera constitutivamente altas cantidades de HLA-G.

Los pasos a seguir son los siguientes:

a) Cuantificación de proteína.

Las muestras se cuantificaron utilizando el kit BCA Protein Assay de Novagen. Este kit está basado en la reacción de Biuret, una reacción que producen los péptidos y las proteínas ya que se debe a la presencia del enlace peptídico (-CO-NH-). Cuando una proteína se pone en contacto con un álcali concentrado, se forma una sustancia compleja denominada Biuret, que se forma a partir de dos de urea ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), y que hace esta reacción positiva. Por tanto, la presencia de proteínas en una mezcla se puede determinar mediante la reacción del Biuret. El reactivo de Biuret contiene CuSO_4 en solución acuosa alcalina (de NaOH o KOH). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presentando un máximo de absorción a 540 nm. El resultado de esta reacción es que, al agregar el reactivo de sulfato de cobre junto a la solución de proteína, se observa una coloración violeta, quedando en el fondo del tubo una tonalidad azul para reacción positiva. En caso que no haya presencia de proteína y la reacción sea negativa, la coloración es amarilla.

Para cuantificar la proteína en suero, LP y LE/LQ se tomaron alícuotas de 100 μl .

Para cuantificar la proteína del tejido endometriósico, se realiza un protocolo previo a la cuantificación para disgregar el tejido:

- A la muestra congelada se le añade buffer de homogenización frío, en proporción 1:5 y se macera el tejido en hielo.
- Se añade 0.01 de volumen de inhibidor de proteasas 100X según el volumen obtenido en el paso anterior, en hielo. Homogeneizar.
- Se centrifuga la muestra a 14000g durante 10min a 4° C.
- Se aspira el sobrenadante y se calcula la concentración de proteínas de la muestra.

- Se añade buffer de carga 3X y se recalcula la concentración de proteína.

b) Preparación de los geles de poliacrilamida: Separador y Concentrador.

Los geles se preparan mezclando, en un recipiente, los componentes indicados en la Tabla 1 (el Persulfato y el TEMED inician la reacción de polimerización, por lo que se deben añadir en último lugar). Rápidamente se procede al llenado con la mezcla. La solución de acrilamida/bisacrilamida se debe utilizar con guantes y pipetear. Primero se polimeriza el gel separador en el soporte para Mini geles de Bio-Rad.

Tabla1. Elaboración de los Geles Separador y Concentrador de Poliacrilamida.

Reactivos	Separador		Concentrador	
	10%	15%		
Agua Desionizada (ml)	4.02	2.34	Agua Desionizada (ml)	3.05
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (ml)	2.5	2.50	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (ml)	1.25
SDS 10 % (ml)	0.1	0.1	SDS 10 % (µl)	50
Archilamida-Bis (ml)	3.33	5	Archilamida-Bis (µl)	650
TEMED (µl)	10	10	TEMED (µl)	10
Persulfato de Amonio (µl)	50	50	Persulfato de amonio (µl)	25
Volumen total (ml)	10	10	Volumen total (ml)	5

c) Electroforesis y transferencia.

- Tomar 50 µg de la solución de proteínas y añadir la tercera parte del buffer de carga 3X Red Loading (New England) + DTT como agente reductor. Calentar las muestras 5 minutos a 95°C.
- Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.

- Cargar las muestras en el gel, junto con un marcador de peso molecular conocido.
- Realizamos la electroforesis con un buffer de tris-glicina (TGS 1X) a un voltaje de 100-130 V durante 2 horas.
- Transferimos el gel a la membrana de nylon (SERVA) a la medida del gel, aprox. 8.5 x 5.5 cm, verificando que no queden burbujas entre gel y membrana. La transferencia se realiza durante 1h a 100V, ó a 30 V toda la noche a 4°C.
- Verificar que la transferencia haya sido efectiva observando el marcador de peso molecular en la membrana y no en el gel.
- Extraer y lavar suavemente la membrana de nylon en PBS 1x + 0.1% de Tween-20 durante unos segundos.

d) Bloqueo de la Membrana.

Previene la unión no específica al anticuerpo primario y secundario de la membrana.

- Incubar la membrana en solución de bloqueo, PBS 1x + 0.1% de Tween-20 + 3% de leche desnatada.
- Lavar la membrana con PBS 1x- Tween-20 al 0.1%, 10 minutos, 3 veces.

e) Incubación con anticuerpos.

- Incubar la membrana con el anticuerpo primario (Monoclonal Antibody IgG to HLA-G Purified Antibody). Realizar una dilución de éste (1:1000) en PBS 1x- Tween 0.1% + 3% de leche desnatada, durante 2 horas ó toda la noche a 4°C en agitación.
- Lavar la membrana 3 veces con PBS 1x-0.1% de Tween-20, 10 min en agitación.
- Incubar la membrana con el segundo anticuerpo (anti-mouse conjugado con peroxidasa, Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate, Novagen). Realizar una dilución de éste (1:1000) en PBS 1x-0.1% de Tween 20 y 3% de leche desnatada durante 1 hora a Tª ambiente en agitación.
- Lavar la membrana con PBS 1x-0.1% Tween 20, 10 min, 3 veces antes de revelar.

f) *Revelado.*

- Mezclar el reactivo de quimioluminiscencia y H₂O₂ al 30% 1:1000 para obtener la solución de detección.
- Quitar el exceso de tampón y añadir la solución de detección directamente e incubar durante 1-2 minutos a T^a ambiente.
- Retirar el exceso de solución de detección y envolver en papel film para revelar en el equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

3. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS POR CITOMETRIA DE FLUJO.

La determinación de células T reguladoras por citometría de flujo se realiza mediante marcaje intracelular del marcador Foxp3, y los marcadores de superficie CD4 y CD25. Para ello se utilizó el kit comercial “Human Regulatory T cell Whole Blood Staining Kit” (eBiosciences, Inc. San Diego, USA), que contiene el anticuerpo monoclonal anti-Foxp3 conjugado con PE (clon PCH101). Para el marcaje de superficie se utilizaron los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD4 humano conjugado con FITC (BD Biosciences) y anti-CD25 humano conjugado con APC (eBiosciences).

Brevemente, y tras ajustar las indicaciones especificadas en el producto, el protocolo seguido fue el siguiente:

1. Preparar las muestras por duplicado en tubos de 12x75mm, previamente identificados, con fondo redondo, aptos para el citómetro.
2. Dispensar en el fondo del tubo 100 µl de sangre completa o del pellet del líquido peritoneal.
3. Añadir 3 µl de anticuerpo anti-CD4-FITC y de anticuerpo anti-CD25-APC. Mezclar.
4. Incubar 15 minutos a T^a ambiente.
5. Añadir 2 ml de solución para lisis de hematíes. Agitar bien.

6. Incubar 15 minutos a T^a ambiente en oscuridad.
7. Centrifugar los tubos 5 minutos a 300 g. Decantar sobrenadante y resuspender el pellet.
8. Lavar los tubos añadiendo 2 ml del tampón de marcaje.
9. Centrifugar 5 minutos a 300 g. Decantar y repetir lavado.
10. Resuspender el pellet utilizando el vórtex. Añadir 1 ml de la solución de fijación/permeabilización celular en cada tubo. Agitar con vórtex.
11. Incubar a 4°C durante 45 minutos en oscuridad.
12. Lavar los tubos con 2 ml del tampón de marcaje centrifugando, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet. Repetir.
13. Reservar uno de los tubos del duplicado para que sirva de control para comprobar que la fijación/permeabilización ha sido correcta, añadiendo 1 ml del tampón y reservando en nevera hasta análisis. En el otro tubo, añadir 3 µl del anticuerpo anti-Foxp3-PE. Agitar.
14. Incubar a 4°C durante 45 minutos en oscuridad.
15. Lavar las células con 2 ml de tampón. Centrifugar y decantar.
16. Resuspender en 1 ml de tampón y adquirir las muestras con el citómetro de flujo para su análisis.

Debido al proceso de fijación/permeabilización, el tamaño y la complejidad en la distribución de las diferentes poblaciones celulares puede variar notablemente respecto a la que muestran las células vivas. Por ello, en las pruebas iniciales para poner a punto el protocolo y previo a adquirir los tubos con las muestras problema, se pasó un tubo con la misma muestra pero sin permeabilizar, para así ajustar los voltajes y las regiones de análisis.

El citómetro empleado para la adquisición de las células fue el FACSCanto II (Beckton Dickinson, Bélgica), equipado con un láser azul (488 nm) y un láser rojo (633 nm). Tiene además 8 detectores, lo que permite trabajar hasta 8 parámetros en una misma muestra: Forward Scatter (FSC, tamaño o volumen celular), Side Scatter (SSC, complejidad celular) y seis colores. Durante la adquisición, las células fueron seleccionadas en función de los parámetros FSC y SSC, para eliminar el debris. La

selección de la población de linfocitos se realizó insertando un gate o región de análisis y se adquirieron 10000 células por tubo. El análisis de los datos se realizó posteriormente usando el software libre WinMDI 2.8.

3.1. PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA.

Tras la recogida de muestras en quirófano, la sangre y el LP se conservaron en nevera hasta su procesamiento para ser analizadas por citometría de flujo en las siguientes 24 horas.

La identificación de linfocitos Treg en una suspensión de células se lleva a cabo mediante el marcaje intracelular de la molécula Foxp3, conjugado con el fluorocromo PE (segunda fluorescencia, FL2). Para ello, las células se someten a un proceso de fijación/permeabilización, y como consecuencia disminuye el tamaño celular de la muestra. Para poner a punto la metodología e identificar con claridad la población a estudio, en los primeros ensayos se analizó cada una de las muestras en tres tubos diferentes.

En el primero de ellos, únicamente se realizó el marcaje de superficie CD4/CD25 (muestra sin permeabilizar) (figura 13A), y en el segundo se realizó el protocolo completo excepto la adición del anticuerpo anti-Foxp3 (células permeabilizadas sin marcar) (figura 13B). Con estos controles, se consiguió ajustar la región de análisis (R1), los parámetros de tamaño (SSC) y complejidad (FSC), y además se comprobó que la permeabilización fue correcta, sin marcaje falso positivo en FL2 (PE) (figura 13C). En el tercer tubo se realizó el protocolo completo y, por tanto, con FL2 detectable (figura 13D).

Una vez ajustadas las condiciones de adquisición, en los ensayos posteriores se preparó un único tubo por muestra en el que se realizó triple marcaje con 3 colores: CD4-FITC, CD25-APC y Foxp3-PE. Las imágenes que se muestran en la figura 14 son representativas de los gráficos de fluorescencia sobre los que se realizó el análisis; en concreto son los datos obtenidos a partir de la región R1 (linfocitos) de la figura 13B (muestra de sangre de una paciente con endometriosis).

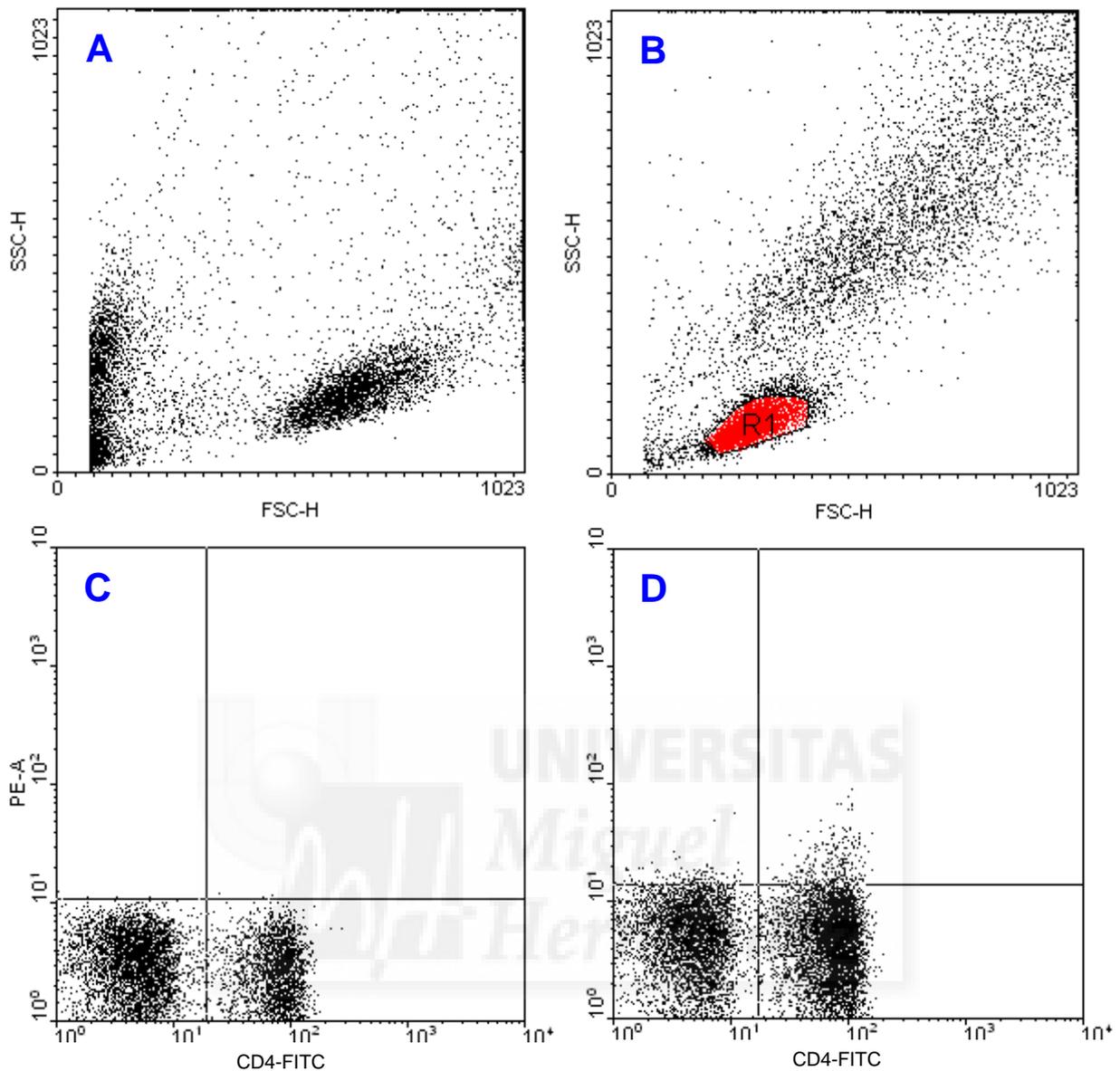


Figura 13. Imágenes representativas del análisis de células T reguladoras por citometría de flujo. A) Células sin permeabilizar. B) Células permeabilizadas, indicando la población de linfocitos como región de análisis R1. En base a la R1 correspondiente: C) linfocitos CD4⁺ con FL2 negativa (sin anticuerpo anti-Foxp3). D) Linfocitos CD4⁺Foxp3⁺. FSC: forward cell (complejidad celular), SSC: size cell (tamaño celular).

En la figura 14A se representan las fluorescencias para los marcadores CD4 y CD25 presentes en la muestra a estudio seleccionada mediante la región R1. Los cuadrantes delimitan varias regiones correspondientes al porcentaje de linfocitos CD4-CD25⁺ (UL), CD4⁺CD25⁻ (LR) y CD4⁺CD25⁺ (UR). La región R2 engloba al total de linfocitos CD4⁺ de la muestra, de forma que a partir de esta región se representa el gráfico B (figura 14B), donde figuran los marcadores CD25 y Foxp3.

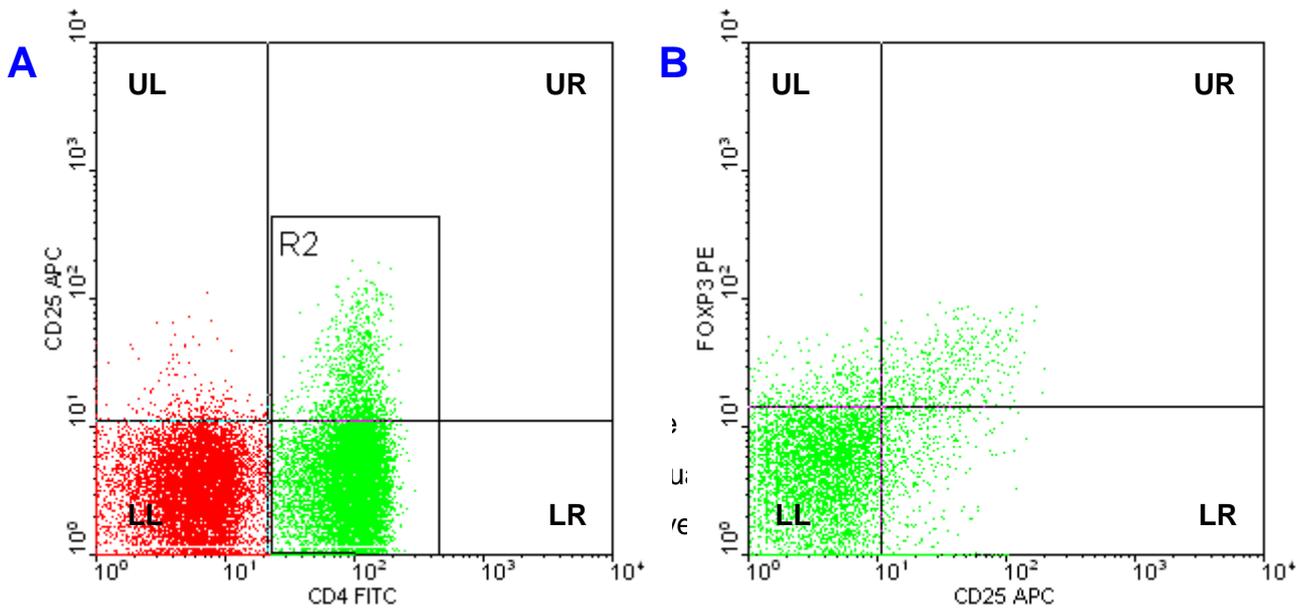


Figura 14. Imágenes representativas del análisis de células T reguladoras por citometría de flujo. A) Células con marcaje CD4-CD25 respecto a R1. UL (up-left): células CD4-CD25+; LR (low-right): células CD4+CD25-. UR (up-right): células CD4+CD25+. La región R2 engloba a todos los linfocitos CD4+. B) Gráfico obtenido a partir de R2 donde se representan las células con marcaje CD25-Foxp3. UL: células CD4+CD25-Foxp3+, UR: células CD4+CD25+Foxp3+.

En el cuadrante UL de la figura 14B aparecen las células CD4+CD25-Foxp3+. En el cuadrante UR aparecen las células CD4+CD25+Foxp3+ que son las células Treg. Este tipo celular presenta una alta expresión del marcador CD25 y suelen nombrarse en la bibliografía como células CD4+CD25^{high} (figura 15).

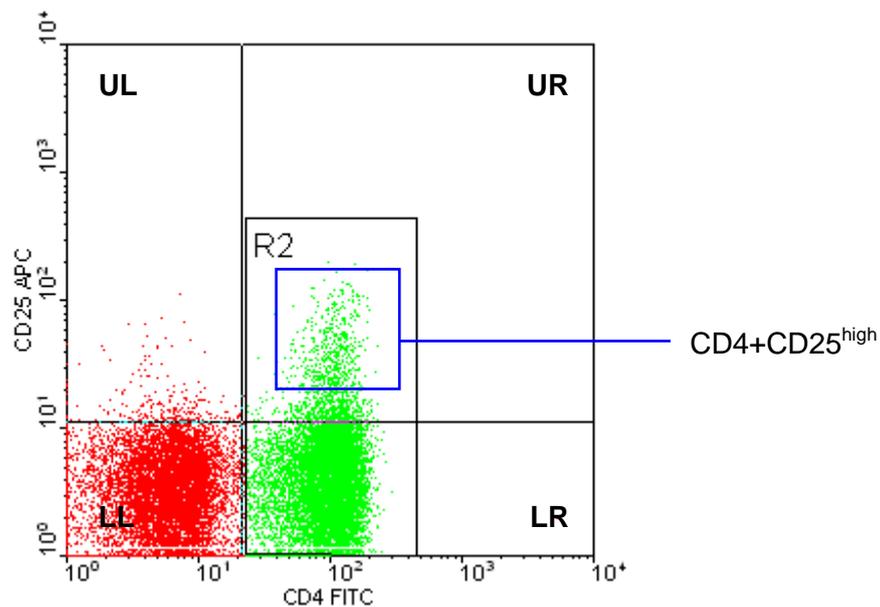


Figura 15: Identificación en el gráfico de la población de CD4+CD25^{high}

4. DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS IL-10 Y TGF-beta MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA.

Para determinar la concentración de las citocinas IL-10 y TGF-beta en suero y LP se utilizaron los kits ELISA comerciales tipo sandwich Platinum para ambas citocinas (eBiosciences, Bender MedSystems GMBH, Viena, Austria), para 96 tests. El límite de detección de los kits es de 3 y 8.6 pg/ml, respectivamente.

Ambos protocolos son similares, por lo que brevemente, y según las indicaciones del producto, se realizó lo siguiente:

1. Preparar los buffers y el patrón de calibración con los diluyentes indicados.
2. Diluir las muestras problema 1:10 con el diluyente indicado (20 µl de muestra en 180 µl de diluyente).
3. Lavar la placa con Wash Buffer 2 veces.
4. Añadir por duplicado 100 µl de los calibradores (pocillos A1-A2 hasta H1-H2).
5. Añadir 60 µl de diluyente al resto de pocillos de la placa.
6. Añadir por duplicado 40 µl de muestra problema.
7. Incubar 2 horas a T^a ambiente en agitación.
8. Lavar la placa 5 veces.
9. Añadir 100 µl del Conjugado Biotina (anticuerpo anti-TGF-β humano conjugado con biotina) a toda la placa.
10. Incubar 1 hora a T^a ambiente en agitación.
11. Lavar la placa 5 veces.
12. Añadir 100 µl de Estreptavidina-HRP a toda la placa.
13. Incubar 1 hora a T^a ambiente en agitación.
14. Lavar la placa 5 veces.
15. Añadir 100 µl de TMB a toda la placa.
16. Incubar 30 minutos en oscuridad.

17. Añadir 100 µl de la solución de parada.

18. Determinar la absorbancia con un espectrofotómetro a 450 nm en los 5-10 minutos siguientes.

Para calcular la concentración de las muestras, se construyó la curva patrón representando mediante escala logarítmica (y posterior ajuste a escala lineal) los datos de absorbancia obtenidos de los calibradores (eje Y) frente a los valores de concentración conocida de dichos calibradores (eje X). Estas concentraciones fueron, para IL-10, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3 pg/ml, y para TGF-beta 2000, 1000, 500, 250, 125, 63 y 31 pg/ml. La ecuación correspondiente a las curvas patrón permitió calcular los datos de concentración de las muestras problema, que se multiplicaron por el factor de dilución y cuyo valor final se expresa en pg/ml.

5. RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de todos los análisis y datos clínicos de cada paciente se registraron en un cuaderno de recogida de datos (CRD) y posteriormente se analizaron con el programa IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago).

Para determinar la distribución de los datos se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov en todas las variables cuantitativas. Las variables cualitativas se evaluaron mediante el test de Chi-cuadrado o de Fisher cuando fue preciso. Para comparar medias entre grupos, se utilizó la t de Student y ANOVA para variables de distribución normal, y el test de U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis como métodos no paramétricos. Para el análisis de muestras relacionadas se utilizó la prueba de rangos de Wilcoxon. Para analizar la relación entre los niveles de HLA-G, citocinas y poblaciones celulares con los parámetros clínicos se utilizaron los test de Correlación de Pearson o Spearman.

La identificación de los factores asociados a la presencia de endometriosis se llevó a cabo mediante regresión logística y en el modelo se incluyeron los variables que obtuvieron significación estadística en el análisis univariante y/o las que pudieran tener una relación clínica posible. Los resultados se presentan como odds ratio (OR) con su correspondiente intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Se analizó la

calibración del modelo de regresión logística mediante el método de Hosmer-Lemeshow y capacidad diagnóstica mediante el área bajo la curva (AUC) ROC de la probabilidad estimada por el modelo.

La incidencia de recurrencias durante el seguimiento se presenta con las curvas de Kaplan-Meier y las diferencias se analizaron mediante el test log rank. El análisis multivariante de las recurrencias se realizó mediante la regresión de riesgo proporcionales de Cox, con el método de inclusión, y se incluyeron en el modelo la esterilidad, los antecedentes de tratamientos para la endometriosis, antecedentes familiares de endometriosis, el tamaño de los endometriomas, la escala analógico-visual de síntomas, los valores de CA-125, los niveles de HLA-G en suero y el porcentaje de células CD4+CD25-Foxp3+ y CD4+CD25+Foxp3+ en sangre. Los resultados se presentan como hazard ratio (HR) con su correspondiente IC 95%. Se atribuyó significación estadística a valores de $p < 0.05$.





RESULTADOS





1. CARACTERÍSTICAS INICIALES DE LA MUESTRA DE ESTUDIO, HALLAZGOS QUIRÚRGICOS Y SEGUIMIENTO CLÍNICO

1.1. CARACTERÍSTICAS INICIALES

Los datos iniciales de los dos grupos de estudio se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Datos iniciales previos a la cirugía

Parámetros iniciales	Endometriosis (N= 120)	No endometriosis (N= 30)	P
Edad	33.96 ± 7.41	31.50 ± 7.07	N.S.
EAV	4.86 ± 2.46	2.81 ± 2.29	<0.01
CA-125 (U/ml)	95.71 ± 154.06	14.35 ± 10.17	<0.05
CA-19.9 (U/ml)	56.25 ± 117.76	7.70 ± 6.59	<0.05
VSG (mm)	18.23 ± 12.27	15.95 ± 18.86	N.S.
Estradiol (pg/ml)	157.71 ± 85.94	167.25 ± 99.87	N.S.

La edad media de las pacientes del grupo endometriosis fue de 33.91 ± 7.41 años y la del grupo de no endometriosis fue de 31.50 ± 7.07 años. En cuanto a la sintomatología, la EAV mostró una puntuación de 4.86 en el grupo de endometriosis frente a 2.81 en el grupo de no endometriosis, siendo las diferencias significativas ($p < 0.01$), al igual que para los marcadores tumorales, más altos en endometriosis ($p < 0.05$). Sin embargo, en parámetros como la VSG (velocidad de sedimentación globular) y el estradiol no hubo prácticamente diferencias. Incluso se observó un mayor nivel de estradiol en sangre en pacientes sin endometriosis, probablemente por la inclusión en este grupo de pacientes con tumores ováricos derivados de células de los cordones sexuales.

En el grupo de endometriosis, el 27% de las pacientes presentaba antecedentes relacionados con la endometriosis. De éstas, observamos que un gran porcentaje había sido previamente sometido a intervención quirúrgica (figura 16).

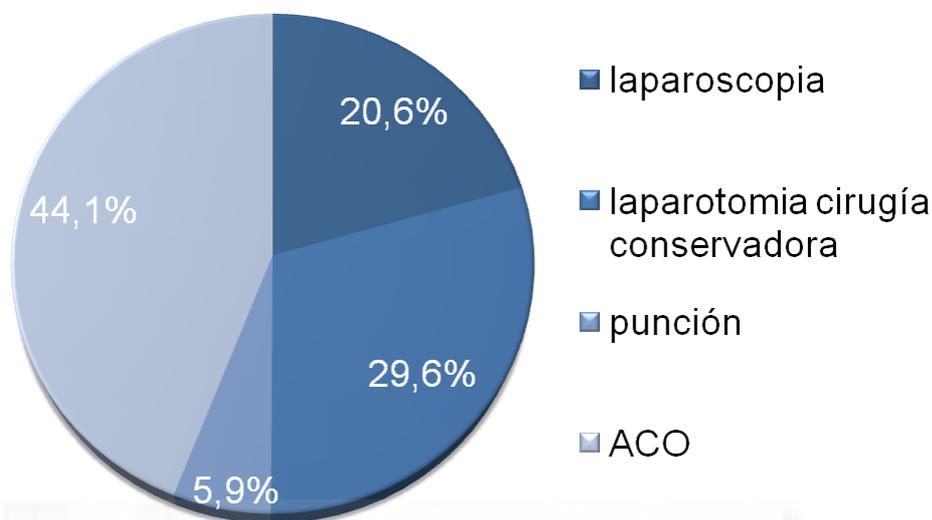


Figura 16. Tratamiento previo en pacientes con endometriosis

1.2. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA, HALLAZGOS E HISTOPATOLOGÍA

Las pacientes fueron sometidas a diferentes tipos de intervenciones, dependiendo sobre todo de los hallazgos ecográficos, patologías asociadas, edad y del deseo genésico. En pacientes con endometriosis fundamentalmente se realizaron laparoscopia quirúrgica y laparotomía con cirugía conservadora (figura 17).

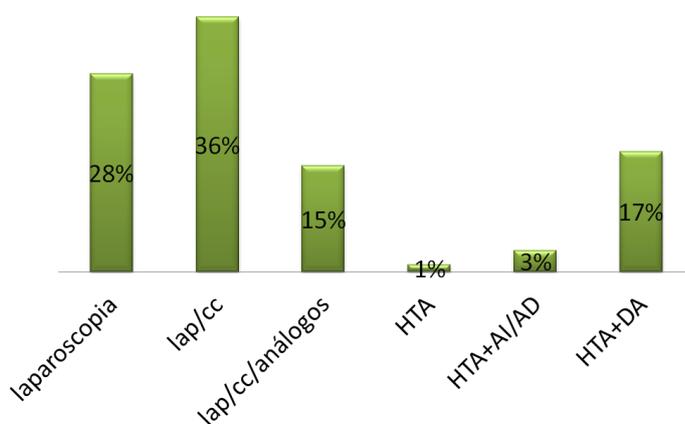


Figura 17. Tipo de intervención quirúrgica en pacientes con endometriosis.

La catalogación de la endometriosis se realizó en quirófano, a la vista de los hallazgos. Del total de las endometriosis, el mayor porcentaje fue catalogado como endometriosis severa (58.3%) frente a un 5.8% de endometriosis leve (figura 18). De estas últimas pacientes, únicamente 14% tuvieron un valor de la EAV significativo.

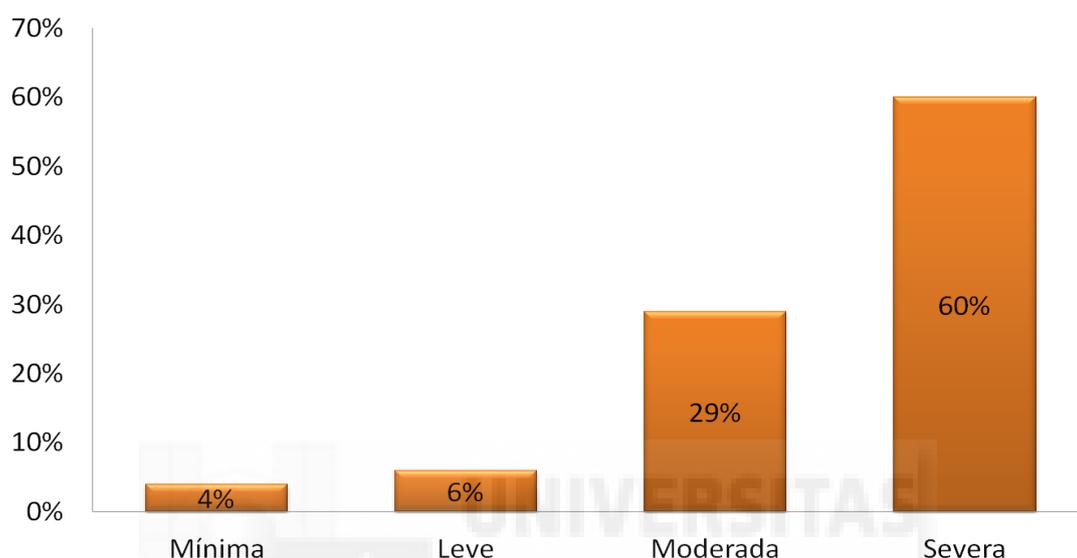


Figura 18. Catalogación de la endometriosis según los hallazgos quirúrgicos.

En las pacientes con endometriosis sometidas a cirugía conservadora, en el grupo de acceso por laparoscopia se observaron 2 bloqueos pélvicos adherenciales que fueron incluidos como endometriosis severa, únicamente 3 casos de endometriosis mínima y el subgrupo que más pacientes incluyó fue el de endometriosis moderada, con 15 casos. Sin embargo entre las pacientes sometidas a laparotomía se observó únicamente un caso de endometriosis mínima frente a 61 casos de endometriosis severa. En este caso el subgrupo de endometriosis moderada incluyó 22 casos.

En los hallazgos quirúrgicos de las pacientes también se tuvo en cuenta la existencia o no de implantes endometriósicos, la presencia o no de endometriosis del septo recto-vaginal y de adenomiosis. En la siguiente tabla (tabla 3) se muestran los hallazgos en las pacientes con endometriosis:

Tabla 3: Otros hallazgos en la cirugía.

Hallazgos	Presencia N (%)	Ausencia N (%)
Implantes peritoneales	54 (45%)	66 (55%)
ESRV	13 (10.8%)	107 (89.2%)
Adenomiosis	20 (16.6%)	100 (83.3%)

Tras la recogida de muestras y análisis de las piezas quirúrgicas, 120 fue el número de pacientes diagnosticadas de endometriosis, 89 de ellas fueron clasificadas como endometriosis quística y de éstas un 9% presentaron atipias celulares. En total se observaron 11 casos (9.2%) de endometriosis atípica. También se tuvo en cuenta la expresión de la molécula p53 en tejido endometriósico y se observó que un 25% de los casos de endometriosis eran p53 positivo. De éstos, sólo un 28% presentó atipia celular.

En cuanto a las pacientes control (no endometriosis), los resultados de la anatomía patológica fueron: 10 tumores serosos, 9 tumores germinales (teratoma quístico maduro), 4 tumores mucinosos, 4 quistes paramesonéfricos, 2 tumores de las células sexuales y 1 quiste de estirpe grasa.

1.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

A partir de los parámetros iniciales de estudio detallados en la tabla 2, se estudió la asociación de éstos con la presencia o no de endometriosis. Los parámetros que se asociaron de forma independiente a la presencia de endometriosis fueron el tamaño del quiste ≥ 2.5 cm, la EAV ≥ 4 , y los valores de CA-125 ≥ 35 U. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4: Odds Ratio (OR) de los parámetros asociados con endometriosis.

Parámetros	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Tamaño >2.5 cm	4.08 (1.45-11.50)	<0.01
EAV >4	4.16 (1.68-10.31)	<0.01
CA-125 >35 U/ml	40.01 (5.12-313.33)	<0.01

El modelo tuvo una calibración correcta (Test Hosmer-Lemeshow $p=0.57$) y una buena capacidad diagnóstica (AUC 0.89 IC 95% 0.84-0.94; $p<0.01$).

2. DETERMINACIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-G.

2.1. NIVELES DE HLA-G Y SU RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS INICIALES.

Atendiendo a los niveles de HLA-G soluble determinados en suero pre-intervención, en LP y LE o LQ de los grupos de estudio, se observaron los siguientes resultados (tabla 5 y figura 19):

Tabla 5. Valores de HLA-G en pacientes con/sin endometriosis

HLA-G (U/ml)	Donantes	Endometriosis	No endometriosis
Suero	42.35 ± 46.04	24.55 ± 37.52	41.62 ± 61.83
LP	-	68.90 ± 64.69	57.42 ± 41.17
LE/ LQ	-	87.08 ± 105.20	9.75 ± 11.03*

Encontramos diferencias significativas entre los valores medios de HLA-G en LE vs LQ ($*p<0.05$), siendo claramente superiores los niveles de HLA-G en los quistes endometriósicos.

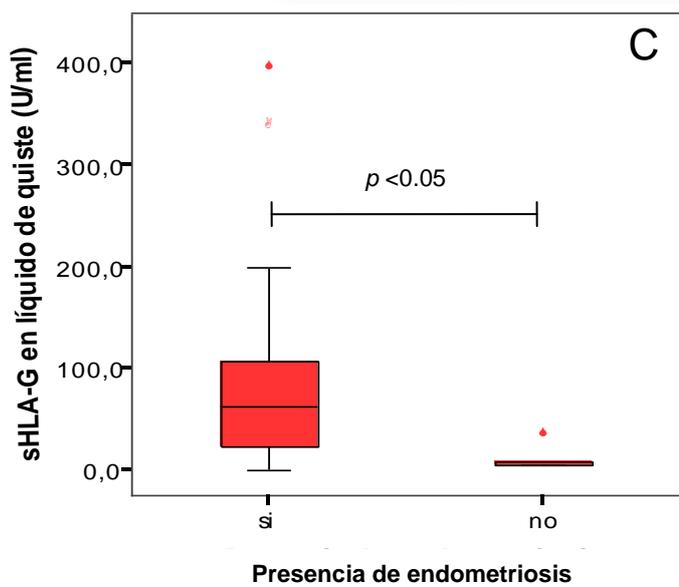
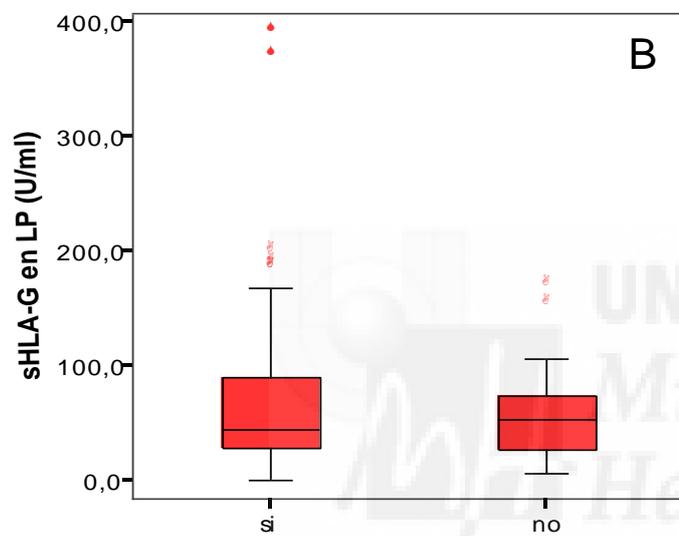
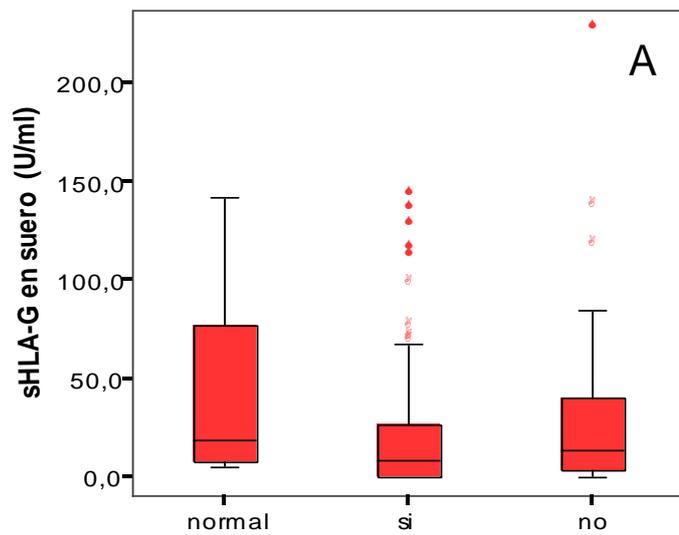


Figura 19. Niveles de HLA-G en suero (A), LP (B) y líquido del quiste (C) en las pacientes con y sin endometriosis. El diagrama de cajas representa los valores de mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 y máximo.

Se han correlacionado para su estudio los niveles de HLA-G en los distintos tipos de muestra y los valores de EAV, CA-125 y tamaño del endometrioma iniciales. En las pacientes con endometriosis, se observó correlación entre los valores de HLA-G en LP y el tamaño de endometrioma visto en ecografía ($R= 0.291$, $p<0.01$), así como entre los niveles de HLA-G en LE y el valor inicial de CA-125 ($R= 0.281$, $p<0.05$) (figura 20).

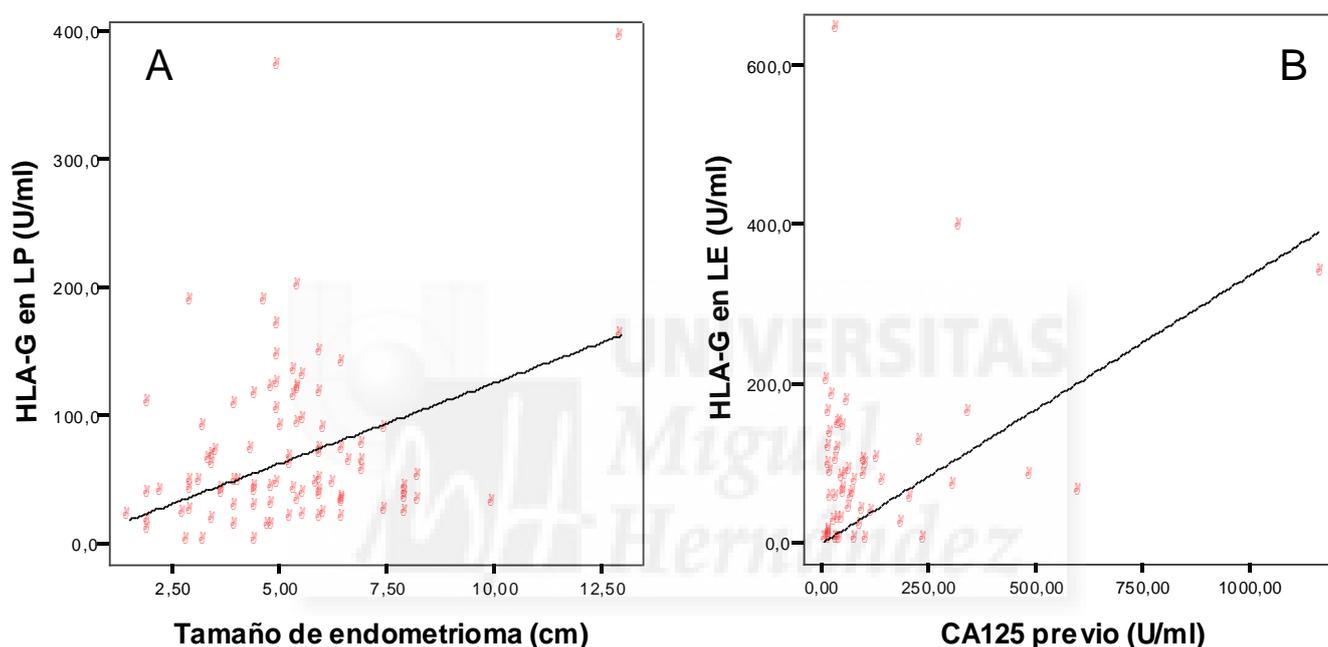


Figura 20. Correlaciones observadas entre los niveles de HLA-G del LP y el tamaño del endometrioma inicial, $p<0.01$ (A) y los niveles de HLA-G en LE y el valor del marcador tumoral CA-125, $p<0.05$ (B) en pacientes con endometriosis.

Tras el análisis de los niveles de HLA-G observamos que en algunas de las muestras no se detectó dicha molécula o se obtuvieron valores prácticamente nulos. Por tanto, realizamos un nuevo análisis de los datos, dando como negativo aquellas muestras que dieran niveles por debajo del límite de detección del kit (3 U/ml) y positivo las que estuvieran por encima.

Así observamos que en un 43% de las pacientes con endometriosis, la prueba resultó negativa en suero. Este porcentaje resultó mucho menor en LP y en LE (3% y 6%, respectivamente). En las pacientes sin endometriosis, el porcentaje de no detección de HLA-G en suero fue mucho menor (13%), mientras que en LP y LQ resultaron todas positivas.

Comparamos también en este sentido los valores de EAV, marcador CA-125 y tamaño de endometrioma en ecografía según si la detección de HLA-G había resultado positiva o negativa, tanto en suero como en LP y en el LE, no encontrando diferencias significativas entre los grupos, excepto en los valores de EAV en suero (4.5 ± 2.0 en HLA-G positivo vs. 6.2 ± 2.4 en HLA-G negativo, $p < 0.05$).

2.2. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA SEVERIDAD Y LA FORMA DE PRESENTACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS

En las pacientes con endometriosis, comparamos los valores medios de HLA-G en suero pre-intervención, LP y LE, según la severidad de la enfermedad, sin encontrar diferencias entre grupos (tabla 6).

Tabla 6. Valores de HLA-G según la severidad de la endometriosis

HLA-G (U/ml)	Mínima	Leve	Moderada	Severa
Suero	–	14.34 ± 16.58	28.72 ± 42.60	23.53 ± 36.72
LP	54.67 ± 53.15	83.40 ± 120.21	64.47 ± 56.15	69.82 ± 60.83
LE	–	4.30	98.50 ± 138.25	82.83 ± 83.22

Además del grado de severidad de la endometriosis, durante la intervención también se distingue la forma predominante en la que se presenta la enfermedad: peritoneal, quística o infiltrante profunda. Al comparar los niveles de HLA-G según esta clasificación observamos que existían diferencias significativas en los valores de HLA-G detectados en LP entre los grupos de endometriosis quística y endometriosis

infiltrante, siendo superiores en este último (58.69 ± 57.79 vs. 81.77 ± 56.64 , $p < 0.05$). También observamos diferencias significativas entre los valores medios de HLA-G en LE entre las pacientes con endometriosis peritoneal o infiltrante (119.46 ± 55.49 vs. 51.08 ± 48.50 , $p < 0.01$), siendo inferiores en éstas.

En pacientes con ESRV (endometriosis infiltrante), el valor de HLA-G en suero fue de 14.67 ± 21.37 vs 26.20 ± 39.44 U/ml en pacientes sin afectación del septo recto-vaginal, pero sin diferencias significativas. Sin embargo, sí las hubieron en los valores de HLA-G en LP entre las pacientes con ESRV y las que no tenían afectación del septo (94.45 ± 57.12 vs. 65.60 ± 65.15 U/ml, $p < 0.05$).

2.3. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA HISTOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS

El estudio histopatológico en endometriosis informó de la presencia o no de atipia celular y de la proteína p53. Al relacionar la presencia o no de atipia con los niveles de HLA-G observamos que dichos valores fueron más altos en endometriosis atípica, tanto en suero (61.92 ± 58.18 vs. 23.79 ± 38.19 U/ml) como en LE (101.80 ± 53.45 vs. 89.54 ± 114.05 U/ml), pero las diferencias no fueron significativas. Al analizar según la expresión de p53 en endometriosis (independientemente de que fuera atípica o no), observamos igualmente un resultado superior para los valores de HLA-G en LE (109.97 ± 142.91 vs. 81.28 ± 90.34) de pacientes p53+, pero tampoco resultó significativo.

En el gráfico siguiente se representan los valores por diagrama de cajas, según la atipia o la expresión de p53 en endometriosis (figura 21):

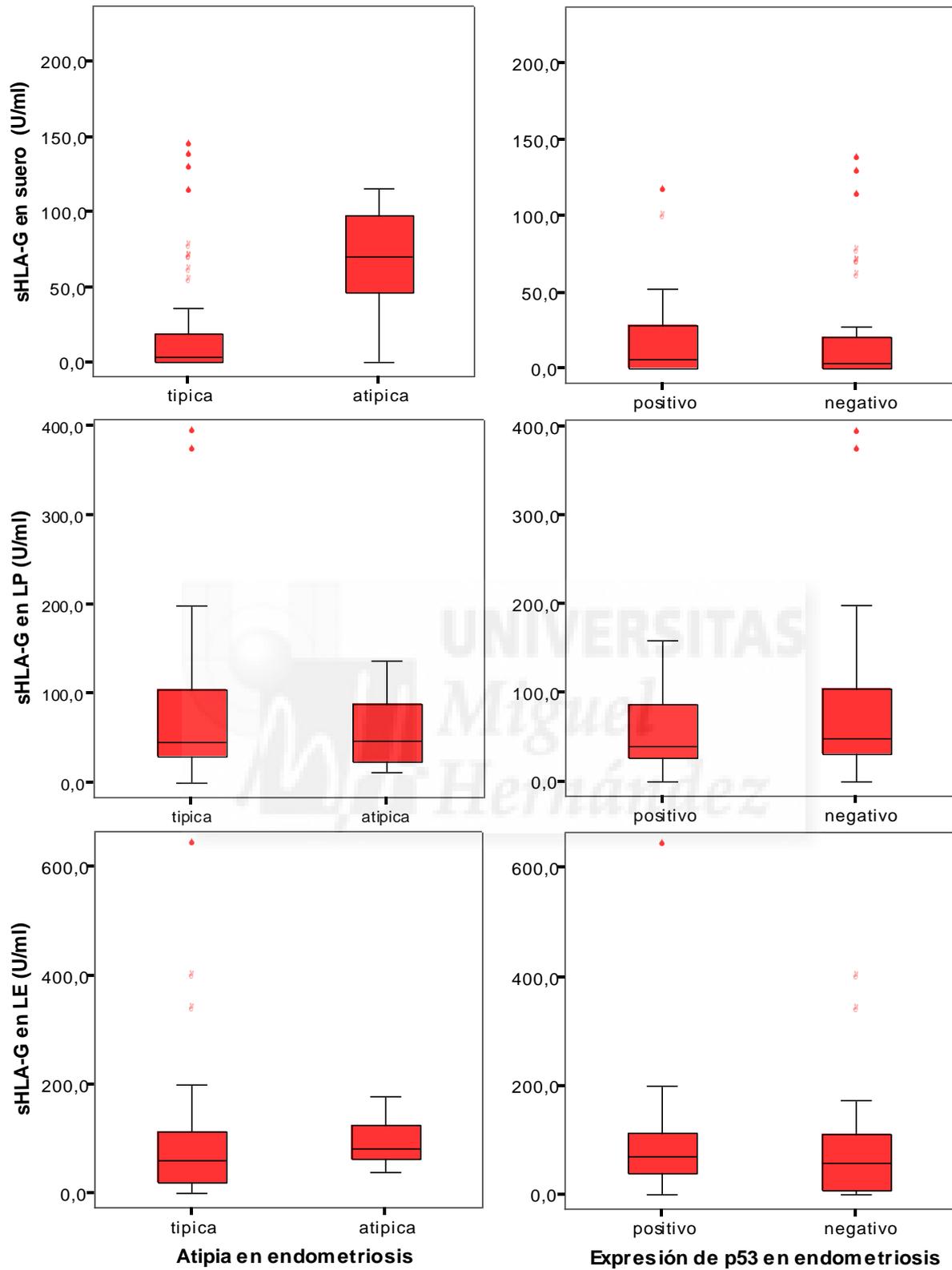


Figura 21. Niveles de HLA-G en suero (A), LP (B) y LE (C) según la presencia de atipia o la expresión de p53. El diagrama de cajas representa los valores de mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 y máximo.

2.4. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA FASE DEL CICLO MENSTRUAL DE LAS PACIENTES

A partir de la historia clínica de las pacientes, se determinó la fase del ciclo menstrual en la que se encontraban en el momento de la toma de muestras, distinguiendo fase proliferativa y fase secretora. En el grupo de no endometriosis se registraron 14 pacientes en fase proliferativa y 16 en fase secretora. En el grupo de endometriosis, 44 pacientes estaban en fase proliferativa y 76 en fase secretora.

En función de la fase del ciclo, se analizaron los niveles de HLA-G observados en cada grupo y no se encontraron diferencias significativas entre pacientes con y sin endometriosis, ni tampoco considerando únicamente a las pacientes del grupo de endometriosis.

Sin embargo, teniendo en cuenta el grado de severidad y el tipo de presentación de endometriosis, sí obtuvimos diferencias reseñables. Respecto al grado de severidad, los valores de HLA-G en LP fueron más altos en endometriosis severa que en endometriosis moderada (94.00 ± 88.90 vs. 40.38 ± 36.28 U/ml, $p < 0.05$) durante la fase proliferativa. En la fase secretora no hubo diferencias en los mismos niveles observados en ambos estadios (56.86 ± 39.89 y 77.28 ± 63.52 U/ml, respectivamente), pero sí entre éstos y los casos de endometriosis mínima (16.30 ± 5.29 U/ml) ($p < 0.01$) (figura 22).

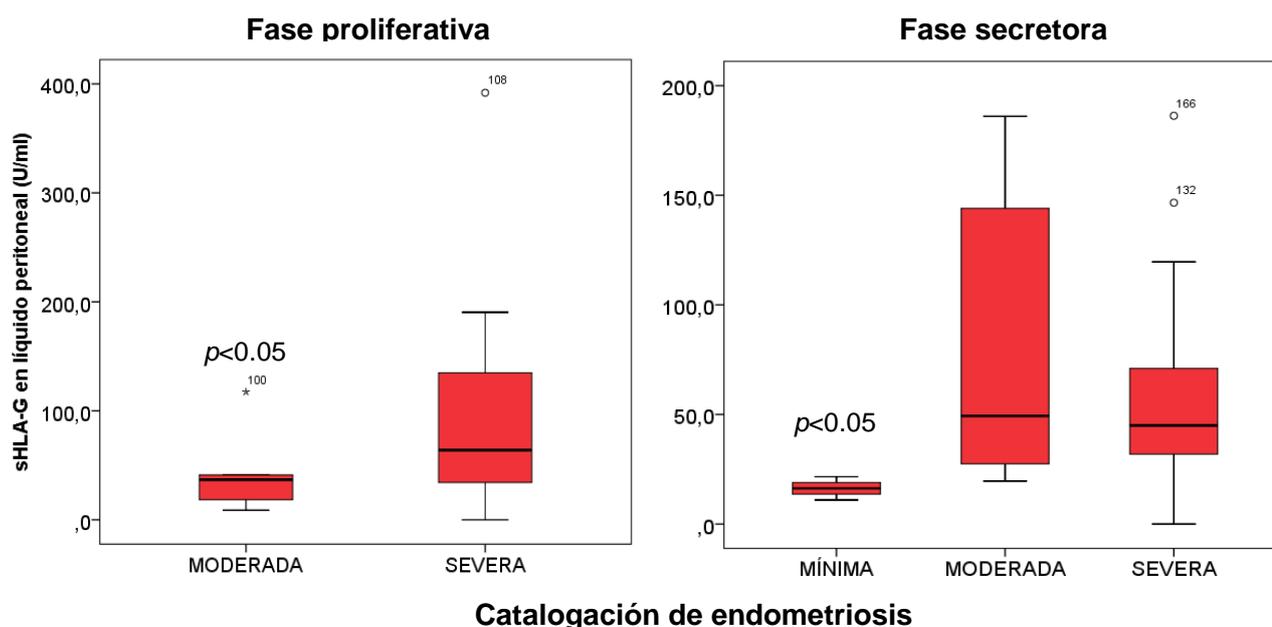


Figura 22. Representación de los niveles de HLA-G en LP según la fase del ciclo en los diferentes estadios de la endometriosis. Según el test de Kruskal-Wallis, en fase proliferativa se observan diferencias entre los estadios de moderada y severa ($p < 0.05$) y en fase secretora, entre los casos de endometriosis moderada y severa respecto a endometriosis mínima ($p < 0.05$).

Respecto a la forma de presentación de la endometriosis, observamos que en fase proliferativa no existen diferencias en los niveles de HLA-G en ninguna de las muestras analizadas, según fuera endometriosis peritoneal, quística o infiltrante. Sin embargo, en la fase secretora, los niveles de HLA-G del LP son significativamente más altos en endometriosis infiltrante (83.34 ± 55.0 U/ml) respecto a endometriosis quística y peritoneal (50.37 ± 36.23 y 36.10 ± 40.24 U/ml, $p < 0.05$) (figura 23).

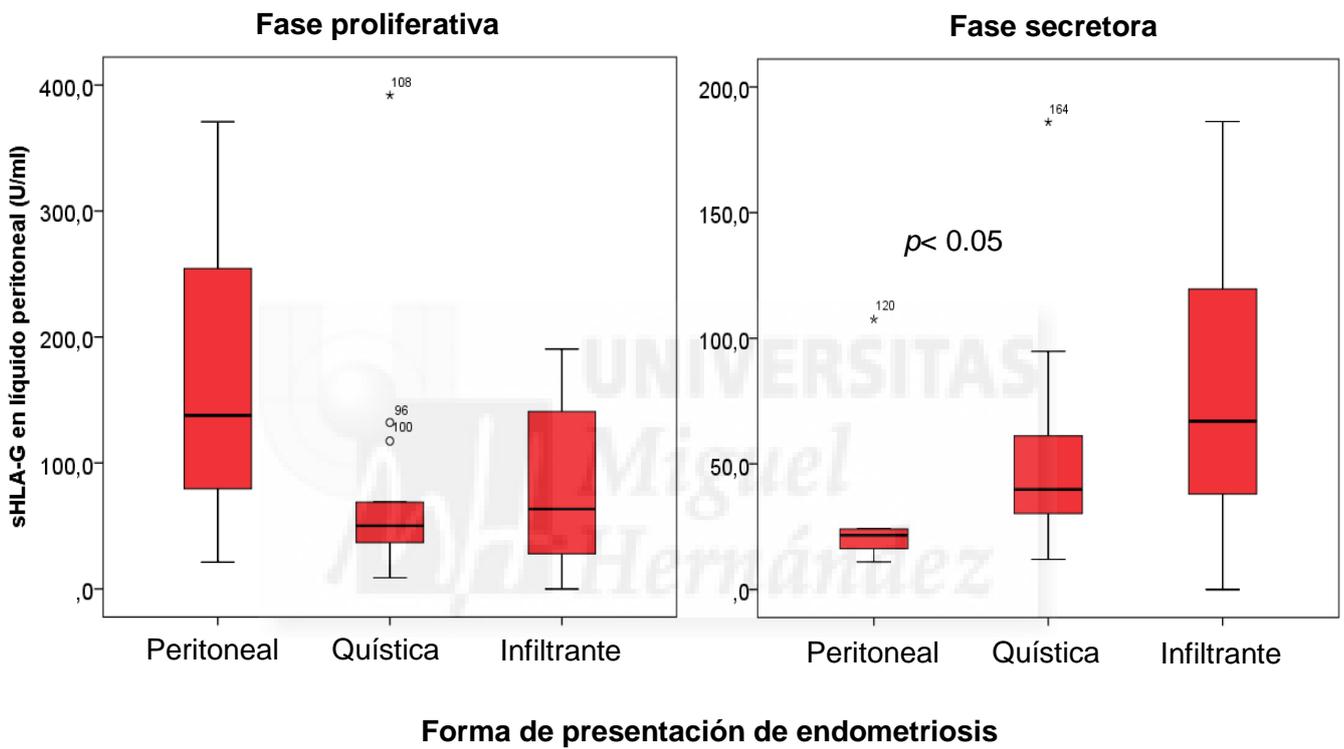


Figura 23. Representación de los niveles de HLA-G en LP según la fase del ciclo en las diferentes formas de presentación de la endometriosis. Según el test de Kruskal-Wallis, en la fase proliferativa no se observan diferencias entre los distintos tipos de endometriosis, pero sí en la fase secretora ($p < 0.05$).

2.5. DETERMINACIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-G MEDIANTE LA TÉCNICA DE WB

En el grupo de pacientes con endometriosis, se han analizado 15 muestras de suero, 19 muestras de LP y 3 muestras de LE. Como resultado en la determinación de HLA-G se obtuvieron 11 de 15 sueros positivos, 14 de 19 LP positivos y 2 de 3 LE positivos. Además, se han procesado muestras de tejido endometriósico y endometrio de 3 de estas pacientes, detectándose HLA-G en todas ellas. El tamaño de la proteína

detectada en todas las muestras es entre 37 y 50 kD y pertenece a las isoformas G1 y G5.

En el grupo de no endometriosis se han analizado 4 muestras de suero, 5 de LP y 2 de LQ. Los resultados obtenidos son 4 de 5 sueros positivos, 4 de 5 LP positivos y 2 de 2 LQ positivos. La banda detectada coincide con la observada en el grupo de endometriosis.

La figura 24 y 25 muestran imágenes representativas de los resultados por WB.

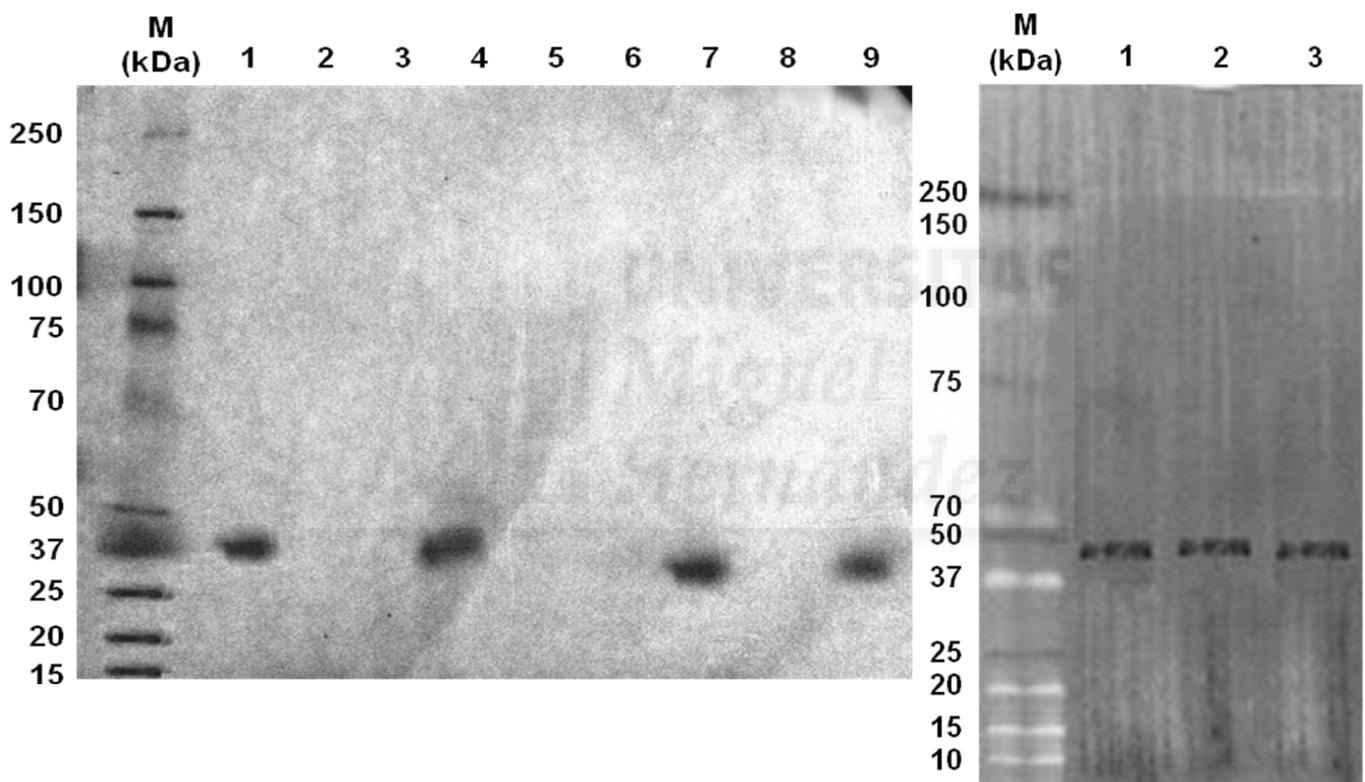


Figura 24. Detección de la molécula HLA-G por la técnica de WB. Se incluyen los resultados de dos pruebas complementarias. La primera calle de ambas imágenes corresponde al marcador de peso molecular (Pm) expresado en kilodaltons (kD) y la calle 1 corresponde con la línea celular JGE3 como control positivo. En la figura de la izquierda, las calles 2-3, 4-5, 6-7 y 8-9 corresponden al suero y LP de 4 pacientes con endometriosis. En la figura de la derecha, las calles 2 y 3 corresponden con el endometrio y el tejido endometriósico de la paciente de las calles 4-5 de la figura anterior.

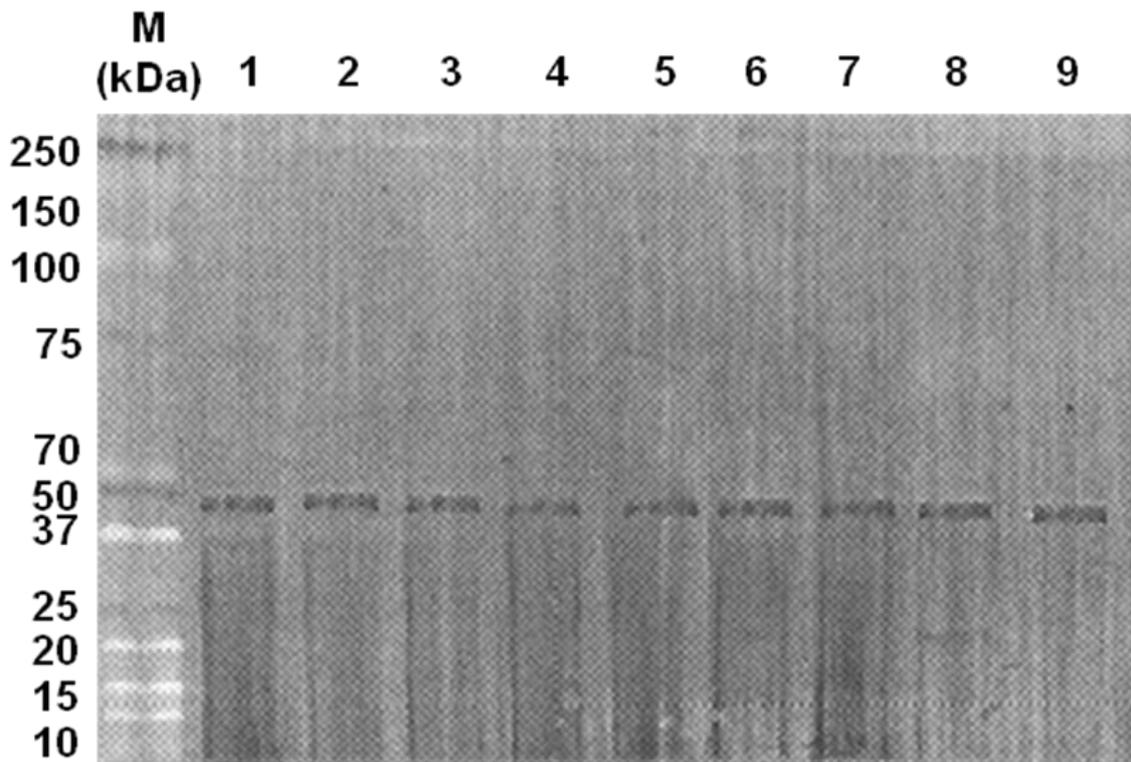


Figura 25. Detección de la molécula HLA-G por la técnica de WB. La primera calle corresponde al marcador de peso molecular (Pm) expresado en kilodaltons (kD) y la calle 1 corresponde con la línea celular JGE3 como control positivo. Las calles 2-3-4 corresponden con el suero, LP y LE de una paciente con endometriosis. Las calles 5-6-7 corresponden con el suero, LP y LQ de una paciente sin endometriosis. Las calles 8-9 corresponden con el suero y LP de una paciente sin endometriosis. Todas las muestras son positivas para la molécula HLA-G.

3. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

3.1. NIVELES DE CÉLULAS TREG Y SU RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS INICIALES

Los porcentajes de las poblaciones linfocitarias obtenidos tras analizar las muestras de sangre y LP en los distintos grupos de pacientes se presentan en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Porcentaje de linfocitos en sangre periférica según el grupo de estudio.

Poblaciones linfocitarias	Endometriosis	No endometriosis	Donantes
CD4+	47.65 ± 10.09	45.78 ± 4.04	45.67 ± 5.57
CD4+CD25+	2.41 ± 1.60	2.65 ± 1.18	3.03 ± 0.95
CD4+Foxp3+	8.43 ± 3.48*	9.06 ± 4.74	5.44 ± 1.41
CD4+CD25+Foxp3-	4.04 ± 2.38*	3.82 ± 2.25**	2.28 ± 2.38
CD4+CD25-Foxp3+	6.13 ± 2.41*	6.59 ± 4.06	3.68 ± 1.27
CD4+CD25+Foxp3+	2.35 ± 1.61 [^]	2.47 ± 1.01 ^{^^}	1.76 ± 0.58

* $p < 0.01$ en endometriosis vs donantes; ** $p < 0.05$ en no endometriosis vs donantes; [^] $p < 0.001$ y ^{^^} $p < 0.01$ en CD4+CD25+Foxp3+ vs CD4+CD25-Foxp3+.

Tras el análisis en sangre, no se observan diferencias entre grupos en las poblaciones totales de CD4+ y CD4+CD25+. Sin embargo, el porcentaje de población CD4+Foxp3+ fue más alto en los grupos de endometriosis y no endometriosis respecto al grupo de donantes, siendo la diferencia significativa para el primer grupo ($p < 0.01$).

Teniendo en cuenta la expresión de los tres marcadores, observamos diferencias significativas en la población CD4+CD25+Foxp3- en los grupos de endometriosis y no endometriosis respecto al grupo de donantes ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). Sin embargo, no se observan diferencias entre grupos en el porcentaje de células con perfil Treg (CD4+CD25+Foxp3+).

La población CD4+CD25-Foxp3+ se mostró más elevada en los grupos de endometriosis y no endometriosis respecto al grupo de donantes, siendo significativa para el primer grupo ($p < 0.01$) (figura 26). Esta población es significativamente más abundante que la población CD4+CD25+Foxp3+, tanto en endometriosis como no endometriosis ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente) (figura 27).

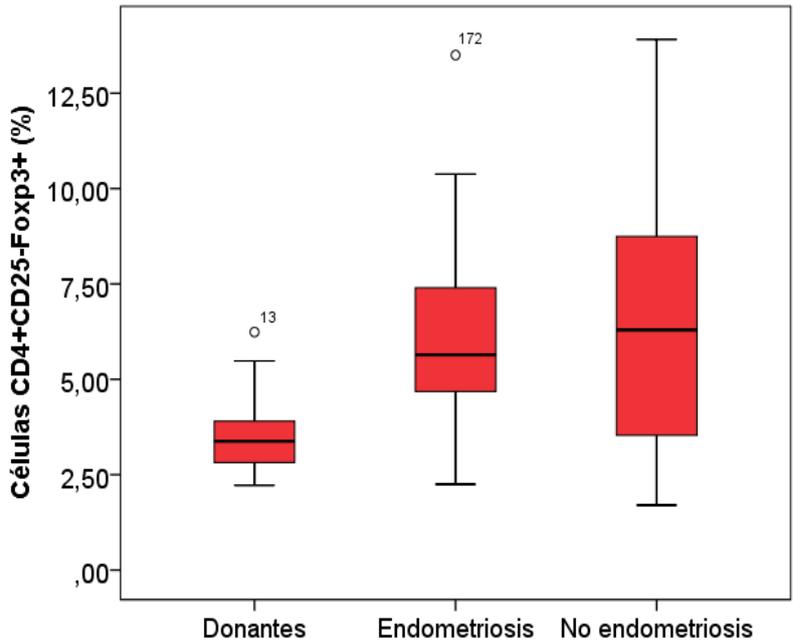


Figura 26. Representación del porcentaje de células CD4+CD25-Foxp3+ en sangre periférica de pacientes con y sin endometriosis respecto al grupo de donantes. Según el test de Kruskal-Wallis, se observan diferencias entre los distintos grupos de estudio ($p < 0.01$).

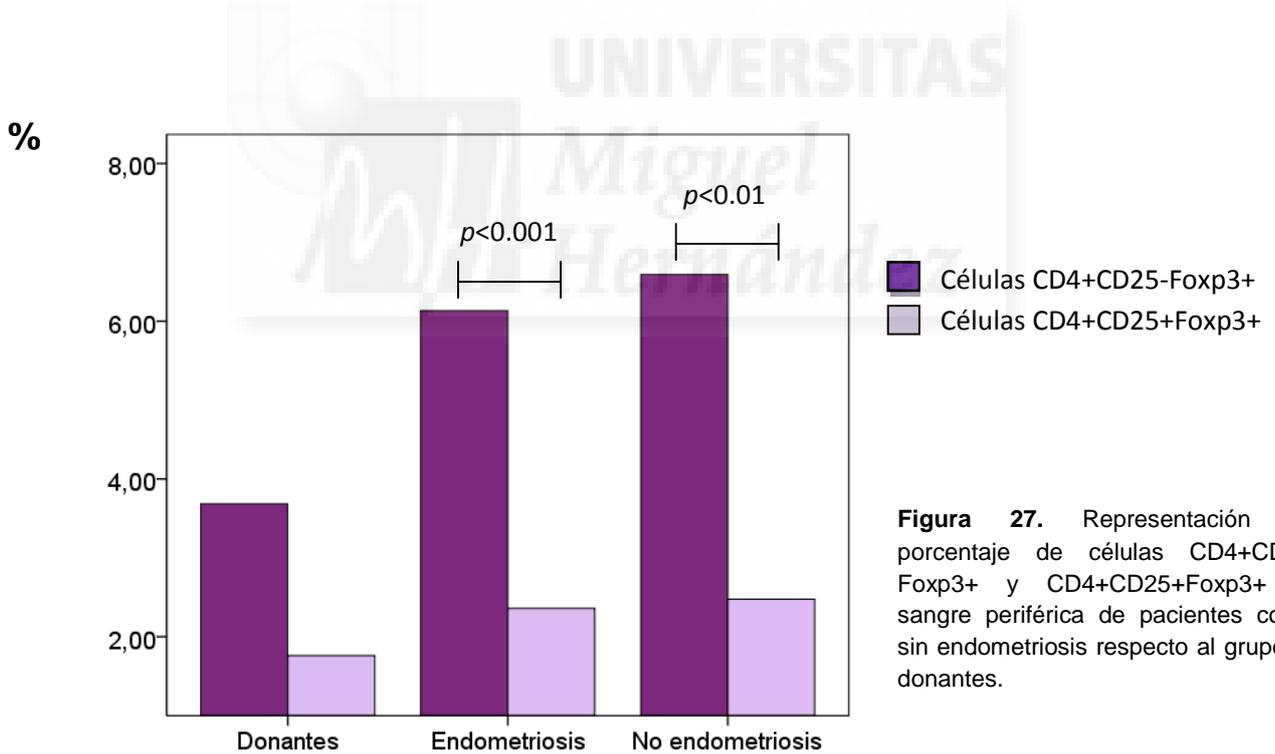


Figura 27. Representación del porcentaje de células CD4+CD25-Foxp3+ y CD4+CD25+Foxp3+ en sangre periférica de pacientes con y sin endometriosis respecto al grupo de donantes.

Los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares detectadas en LP de las pacientes en estudio se muestran en la tabla 8:

Tabla 8. Porcentaje de linfocitos en LP según el grupo de estudio.

Poblaciones linfocitarias (%)	Endometriosis	No endometriosis
CD4+	29.26 ± 9.75	28.01 ± 9.21
CD4+CD25+	1.79 ± 1.38	1.99 ± 2.02
CD4+Foxp3+	14.68 ± 6.98	14.38 ± 6.54
CD4+CD25+Foxp3-	3.26 ± 2.11	3.98 ± 1.14
CD4+CD25-Foxp3+	10.94 ± 5.37	10.80 ± 5.20
CD4+CD25+Foxp3+	3.75 ± 3.11 [^]	3.59 ± 2.28 ^{^^}

[^] $p < 0.001$ y ^{^^} $p < 0.05$ en CD4+CD25+Foxp3+ vs CD4+CD25-Foxp3+.

No se observan diferencias entre los grupos de estudio en ninguna de las poblaciones analizadas en el LP. Sin embargo, al igual que sucede en sangre, la población CD4+CD25-Foxp3+ es significativamente más abundante que la población CD4+CD25+Foxp3+ tanto en endometriosis como no endometriosis ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente).

El grupo de donantes no se incluyó en este análisis puesto que no se disponía de muestras de LP de las mismas.

Teniendo en cuenta los valores iniciales de los parámetros clínicos de las pacientes (EAV, CA-125 y tamaño del endometrioma), no se observó ninguna correlación con los valores de poblaciones linfocitarias en sangre y LP.

3.2. NIVELES DE CÉLULAS TREG Y SU RELACIÓN CON LA SEVERIDAD Y LA FORMA DE PRESENTACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS

Considerando el grado de severidad de la endometriosis se analizaron los porcentajes de poblaciones linfocitarias en sangre y LP. En sangre, únicamente encontramos diferencias significativas entre los casos de endometriosis moderada y severa en el porcentaje de linfocitos CD4+CD25-Foxp3+ (5.08 ± 2.36 vs 6.88 ± 2.29 , respectivamente; $p < 0.05$). En LP no se encontraron diferencias en ninguna de las poblaciones celulares.

Si atendemos a la forma clínica en la que se presentó la endometriosis, en sangre únicamente observamos diferencias significativas en las poblaciones CD4+CD25+ entre la endometriosis peritoneal y quística ($p<0.05$). En LP, el porcentaje de células CD4+ es más elevado en endometriosis quística e infiltrante respecto a la peritoneal (29.56 ± 9.57 y 32.70 ± 10.23 vs 16.44 ± 3.54 , respectivamente; $p<0.01$). La población CD4+CD25- es más alta en endometriosis infiltrante que en la peritoneal (30.60 ± 7.73 vs 15.27 ± 2.88 ; $p<0.01$); respecto a la quística no hay diferencias.

3.3. NIVELES DE CÉLULAS TREG SEGÚN LA HISTOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS

Se han comparado los casos de endometriosis atípica vs típica, sin encontrar diferencias entre los porcentajes de las diferentes poblaciones linfocitarias en sangre y LP.

Atendiendo a la expresión de p53 en endometriosis, tampoco se encontraron diferencias en las poblaciones de linfocitos en tanto en sangre como en LP.

3.4. NIVELES DE CÉLULAS TREG SEGÚN LA FASE DEL CICLO MENSTRUAL DE LAS PACIENTES

Estudiamos en las pacientes los porcentajes de las distintas poblaciones linfocitarias, tanto en suero como en LP, dependiendo de la fase del ciclo menstrual (fase proliferativa y fase secretora) en la que se encontraban. No se encontraron diferencias significativas en las poblaciones celulares entre pacientes con y sin endometriosis.

Seleccionando las pacientes con endometriosis, se observaron diferencias significativas entre la fase proliferativa y la fase secretora para los linfocitos CD4+CD25+ (1.69 ± 1.41 vs 3.14 ± 1.62 ; $p<0.05$) y CD4+CD25+Foxp3+ (1.72 ± 1.28 vs 3.50 ± 1.72 ; $p<0.01$), en sangre. En LP encontramos diferencias en el porcentaje de linfocitos CD4+ totales (23.74 ± 7.53 vs 31.2 ± 7.41 ; $p<0.05$) y en el de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ (3.30 ± 3.15 vs 5.41 ± 3.35 ; $p<0.05$).

En el análisis también se tuvo en cuenta los grupos de severidad de endometriosis y la forma de presentación de la patología en las diferentes fases del ciclo. No se observaron diferencias entre los diferentes estadios. En fase proliferativa, se encontraron diferencias significativas en los niveles de células CD4+CD25-Foxp3+ en LP entre endometriosis quística e infiltrante (18.36 ± 5.23 vs 10.57 ± 3.11 ; $p < 0.05$). En fase secretora, se observaron diferencias entre endometriosis quística e infiltrante en el porcentaje de linfocitos CD4+CD25+Foxp3- en sangre (5.68 ± 2.91 vs 4.52 ± 2.80 ; $p < 0.05$).

4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS IL-10 Y TGF- β

Estudiamos los niveles de las citocinas IL-10 y TGF- β en suero y en LP entre las pacientes con y sin endometriosis (tabla 9). No se observaron significativas entre grupos.

Tabla 9. Niveles de citocinas en suero y LP según el grupo de estudio.

Citocinas (pg/ml)	Endometriosis	No endometriosis
IL-10 en suero (pg/ml)	2.45 ± 3.40 (0-15.0)	2.26 ± 3.66 (0-10.9)
TGF- β en suero (mg/ml)	33.91 ± 38.42 (2-217)	26.8 ± 12.3 (2.2-39.0)
IL-10 en LP (pg/ml)	14.51 ± 21.66 (0-126)	9.42 ± 14.35 (0-50)
TGF- β en LP (mg/ml)	3.2 ± 2.6 (0-14.1)	1.7 ± 1.3 (0-2.9)

Los valores de citocinas se expresan como media \pm DS y entre paréntesis los valores de mínimo y máximo.

Los niveles de IL-10 fueron muy bajos en ambos grupos y en algunos casos no fueron detectables. Los niveles de TGF- β presentaron valores mucho más altos, principalmente en suero, aunque en algunos casos tampoco se detectó dicha citocina.

Atendiendo a los parámetros iniciales (EAV, tamaño de endometrioma y marcador CA-125), se han correlacionado sus valores con los de las citocinas estudiadas, observándose en endometriosis una correlación positiva y significativa

entre los valores de EAV y TGF- β en suero ($r=0.448$, $p<0.01$), y entre los valores de CA-125 e IL-10 ($r=0.471$, $p<0.01$) y TGF- β ($r=0.455$, $p<0.01$) en suero.

No se ha observado ninguna correlación entre los niveles de citocinas IL-10 y TGF- β y los porcentajes de poblaciones linfocitarias según los marcadores CD4, CD25 y Foxp3.

5. ANÁLISIS DEL RIESGO DE RECURRENCIAS

5.1. SEGUIMIENTO CLÍNICO Y VALORACIÓN DE RECURRENCIAS

Las pacientes acudieron a control a los 3-6 meses de la intervención (control 1) y a los 9-12 meses post-intervención (control 2). Los datos clínicos observados y, por tanto, las recurrencias se muestran en la tabla 10. La mediana de seguimiento fueron 13.6 meses (rango intercuartílico 5.0-19.5).

Los parámetros clínicos y analíticos considerados en estos controles fueron el valor de la EAV, los niveles de CA-125 y el tamaño del endometrioma. Los valores de los tres parámetros fueron ligeramente más altos en el control 2 respecto al primer control.

Atendiendo a las recurrencias de parámetros, observamos que un 17.5% de las pacientes intervenidas por endometriosis presentó una sintomatología relevante en el primer control frente a un 21.5% en el control posterior. Sin embargo, el marcador CA-125 se observó elevado en 19 pacientes en el control 1 y en 15 pacientes en el control 2, aunque con porcentajes similares. El número de pacientes que volvieron a presentar endometriomas tras la intervención fue mayor al año de la intervención (en el control 2).

En la tabla 10 también se incluyen los hallazgos ecográficos en ambos controles. En la mayoría de las pacientes no se encontró ningún hallazgo sugerente de patología, por tanto, se consideró normal. En cuanto al hallazgo de ESRV, en el primer control se observaron 4 casos de los cuales 3 eran ya conocidos previamente y uno apareció *de novo*. Estas 4 pacientes mantuvieron las lesiones en el segundo control, junto con la recidiva tardía de un caso más.

Tabla 10: Datos clínicos y analíticos post-intervención

Parámetros	Control 1	Recurrencias N (%)	Control 2	Recurrencias N (%)
EAV	1.87 ± 2.10	19 (17.5%)	2.12 ± 2.40	19 (21.5%)
CA-125 (U/ml)	24.06 ± 24.32	19 (17.5%)	27.61 ± 36.54	15 (17.0%)
Endometrioma (cm)	2.65 ± 1.54	7 (6.3%)	3.08 ± 1.38	10 (11.1%)
Hallazgos ecográficos	N (%)		N (%)	
Normal	76 (70.4%)		62 (60.5%)	
Endometrioma	16 (14.5%)		14 (15.5%)	
ESRV	4 (3.0%)		5 (5.7%)	
Otros quistes	13 (13.9%)		6 (6.8%)	
Mioma	1 (0.9%)		3 (3.4%)	
Clínica al año post-intervención N (%)				
Normal	Recurre 1 parámetro		Recurren 2 ó 3 parámetros	
88 (72.0%)	16 (13.8%)		16 (13.8%)	

De las 16 pacientes (14.5%) que presentaron un nuevo endometrioma en la primera revisión sólo 9 lo seguían presentando en el segundo control, es decir, al año aproximadamente de la intervención. Cinco pacientes que no presentaron endometrioma en el primer control ecográfico, sí lo presentaron en el control anual. Sin embargo, 4 pacientes que en la ecografía previa mostraron un pequeño endometrioma (< 2 cm), en el control posterior no lo hicieron.

Del total de las pacientes que presentaron nuevos endometriomas en los controles posteriores, se consideraron como recurrentes las que presentaban un tamaño de endometrioma ≥ 2.5 cm (6.3%). El tamaño medio de los endometriomas en

las recurrencias fue de 3.6 ± 1.54 cm en el control 1 y de 3.71 ± 1.38 cm en el control 2.

Valoramos la clínica al año de la intervención, observando que un 72% de las pacientes permaneció asintomático. El resto de las pacientes presentó alteración de algún parámetro. A partir de un año de la intervención se siguió controlando a un total de 42 pacientes (control 3). La media de meses desde la intervención hasta el tercer control fue de 21.43 ± 7.37 meses. Se observó que un 73.7 % de las pacientes intervenidas por endometriosis permanecían asintomáticas. El resto presentaba 1 ó más parámetros alterados relacionados con las recurrencias (aumento del marcador CA-125, EAV ≥ 4 , endometrioma ≥ 2.5 cm). Estos resultados son similares a los observados en el control al año de la intervención.

El tiempo medio de recurrencia de los síntomas desde la intervención fue de 7.94 ± 5.02 meses (n= 31), de la aparición de un nuevo endometrioma de 13.21 ± 9.88 meses (n= 14) y del aumento del CA-125, de 10.35 ± 9.04 meses (n= 23). Teniendo en cuenta estas 3 variables, se observó que la recurrencia global (2 o más parámetros alterados) se presentó a los 13.57 ± 10.64 meses (n= 26). En estos cálculos están incluidas las pacientes con ESRV. Éstas presentaron un tiempo medio de recurrencia de síntomas de 10.65 ± 5.06 meses y de recurrencia de CA-125 de 7.55 ± 3.04 meses.

5.2. NIVELES DE HLA-G SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA TRAS LA INTERVENCIÓN

En cuanto a los valores de HLA-G en relación a la evolución clínica observada en las pacientes con endometriosis al año de la intervención, encontramos que los niveles en suero eran más altos en las pacientes que mostraron una evolución clínica favorable, y sin embargo los niveles de HLA-G en LE fueron más altos en las pacientes que posteriormente mostraron reactivación de la enfermedad. No obstante, las diferencias no fueron significativas (tabla 11).

Tabla 11. Valores HLA-G según las recurrencias observadas al año.

HLA-G (U/ml)	No recurrente (N= 89)	Recurre 1 parámetro (N= 17)	Recurrente (≥ 2 parámetros) (N= 17)
Suero	34.69 \pm 49.87	5.65 \pm 5.68	19.01 \pm 31.34
LP	64.96 \pm 60.41	85.05 \pm 99.09	76.53 \pm 42.67
LE	68.22 \pm 72.05	86.61 \pm 58.71	146.48 \pm 223.56

En cuanto al tiempo hasta recurrencias de cada uno de los parámetros, observamos una correlación positiva y significativa entre los valores de HLA-G en suero ($r=0.687$, $p<0.01$) y LP ($r=0.399$, $p<0.05$) con el tiempo de reactivación de los síntomas (figura 28). Es decir, a mayor nivel de HLA-G en suero y LP, mayor es el intervalo de la paciente libre de enfermedad.

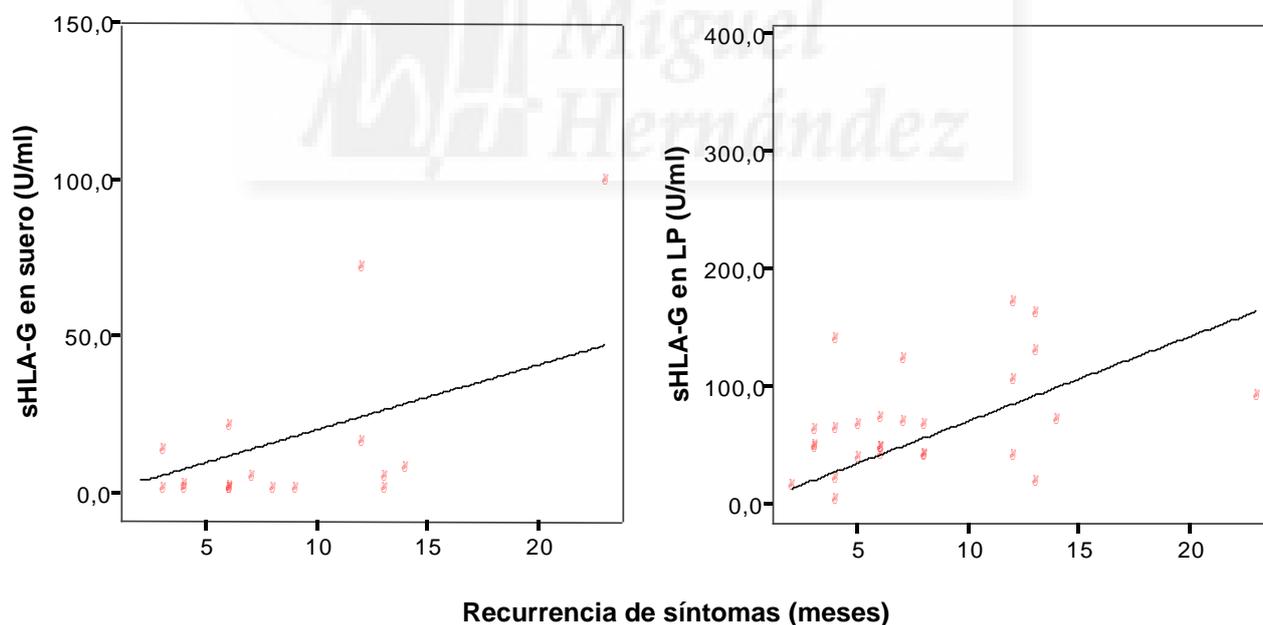


Figura 28. Representación de las correlaciones entre los niveles de HLA-G en suero y LP y el tiempo transcurrido hasta recurrencia de síntomas.

5.3. NIVELES DE CÉLULAS TREG SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA TRAS LA INTERVENCIÓN

Se compararon los niveles de células Treg entre las pacientes que recurrieron al año y las que no, sin encontrar diferencias significativas entre ellas. En cuanto al tiempo hasta recurrencias de cada uno de los parámetros (endometrioma, síntomas y CA-125), observamos una correlación positiva y significativa entre los niveles de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ en sangre y las recurrencias de endometriomas ($r=0.994$, $p<0.01$) y del marcador CA-125 ($r=0.801$, $p<0.05$). En LP, sólo observamos correlación entre las células CD4+CD25+Foxp3- y la recurrencia de endometriomas ($r=0.955$, $p<0.05$).

5.4. ANÁLISIS DE LA TASA Y LOS RIESGOS DE RECURRENCIAS

Para el análisis de las recurrencias se seleccionaron como posibles factores pronóstico, el tamaño de los endometriomas, la EAV, los valores de CA-125, los niveles de HLA-G en suero y el porcentaje de células CD4+CD25-Foxp3+ y CD4+CD25+Foxp3+ en sangre.

Se observó mayor tasa bruta significativa de recurrencia global en las pacientes con valores iniciales de tamaño del endometrioma ≥ 2.5 cm o EAV ≥ 4 (figura 29).

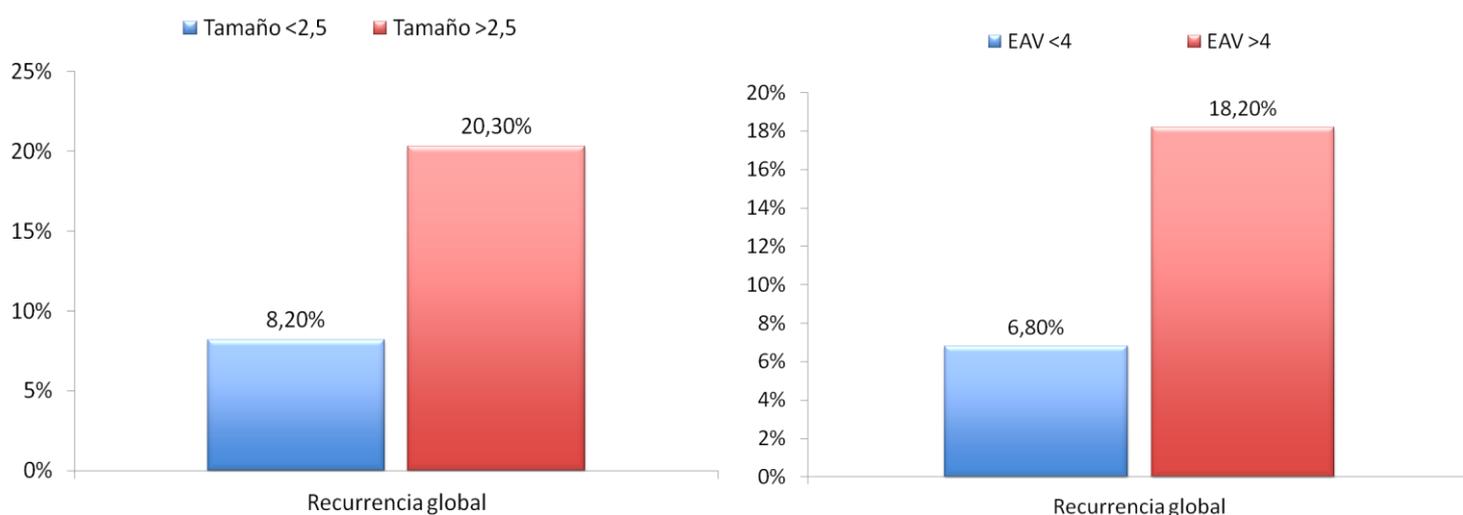


Figura 29: Tasa de recurrencia global según el tamaño del endometrioma y la EAV.

Lo mismo sucede con las pacientes con CA-125 previo ≥ 35 U/ml, en las que se observó posteriormente una mayor tasa bruta significativa de recurrencia (figura 30).

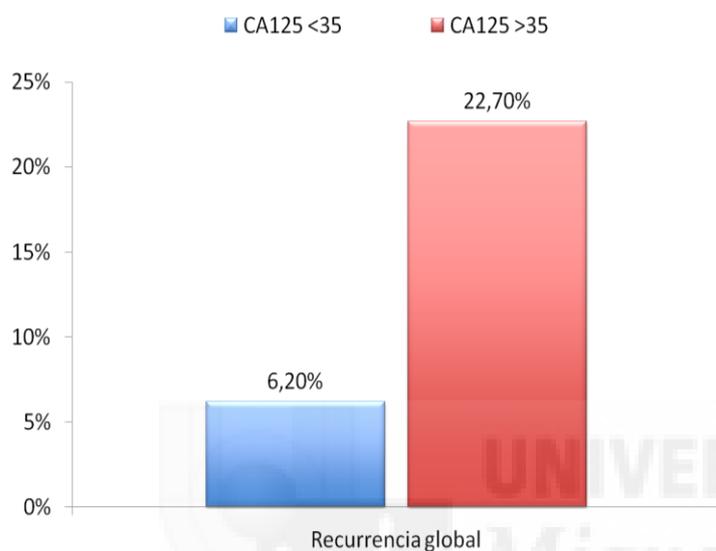


Figura 30: Tasa de recurrencia global según el marcador CA-125.

Respecto a los otros tres marcadores seleccionados en sangre (células CD4+CD25+Foxp3+ y CD4+CD25-Foxp3+, y valores de HLA-G) dividimos las pacientes en función de si presentaban valores por encima de la mediana o no y se observó una tendencia a mayor tasa de recidivas en aquellas que presentaban niveles celulares por encima de la mediana, como se observa en la figura 31.

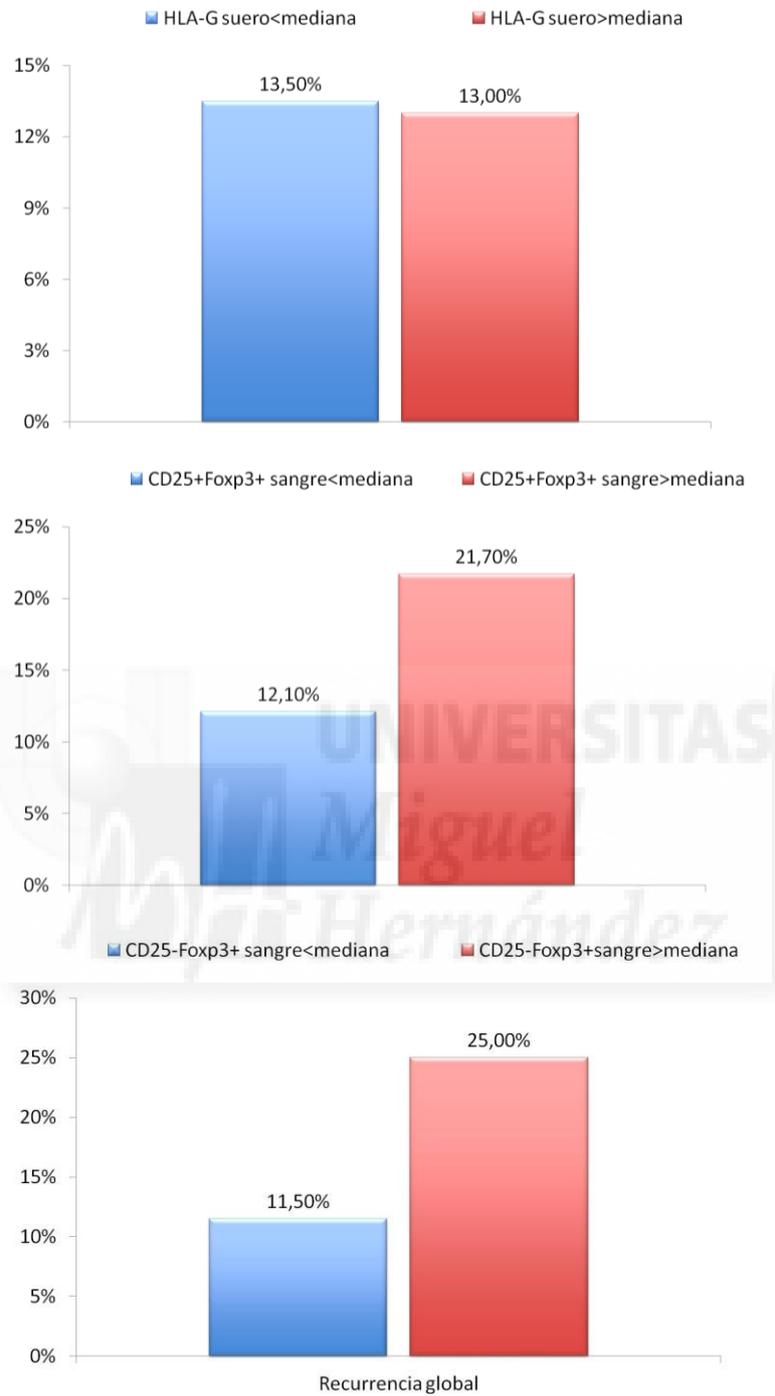


Figura 31: Tasa de recurrencia global según los valores de mediana de HLA-G en suero, y de CD4+CD25+Foxp3+ y CD4+CD25-Foxp3+ en sangre.

A continuación se tuvieron en cuenta las características de las pacientes según estos 6 parámetros analizados, de forma que se otorgó una puntuación de 1 cuando las pacientes presentaban valores positivos o por encima de la mediana para cada una de las variables. De esta manera, sumando cada valor, las pacientes podían presentar valores de 0 a 6. Al analizar la incidencia de recurrencias en función de esta puntuación se observó una tendencia creciente ($p < 0.01$) como se muestra en la gráfica (figura 32).

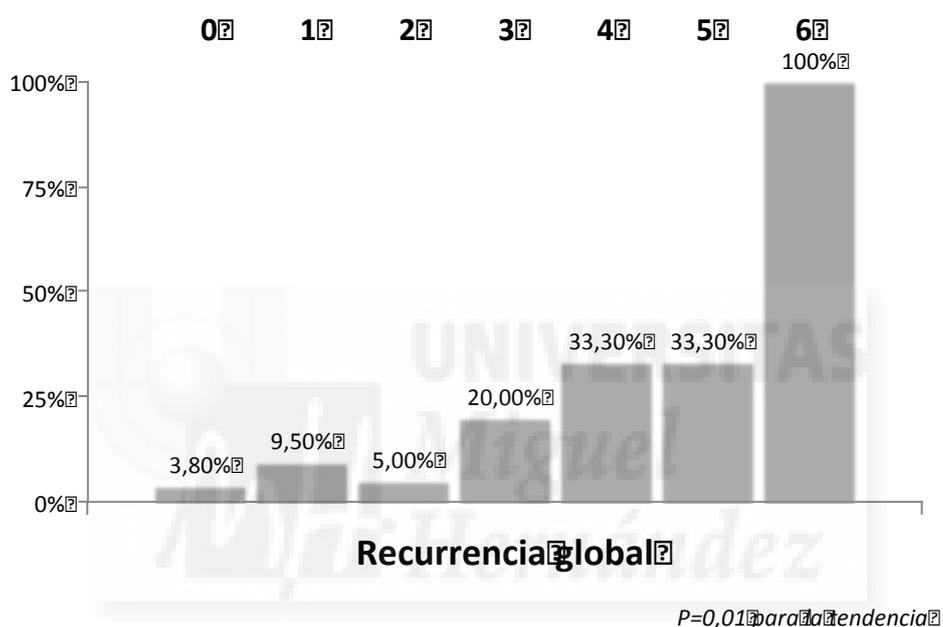


Figura 32: Recurrencia global según la presencia de los parámetros seleccionados. Existe una tendencia a aumentar la tasa de recurrencias cuanto mayor sea el número de parámetros.

Dado que la recurrencias aumentaban claramente cuando las pacientes presentaban 3 ó más de las características analizadas se dividió la población en dos grupos: grupo 1, si tenían 0, 1 ó 2 de las 6 variables analizadas y grupo 2, cuando presentaban 3 ó más. Al analizar la incidencia de recurrencias entre estos dos grupos se obtuvo una incidencia significativamente superior ($p < 0.01$) en el grupo 2 (ver figura 33).

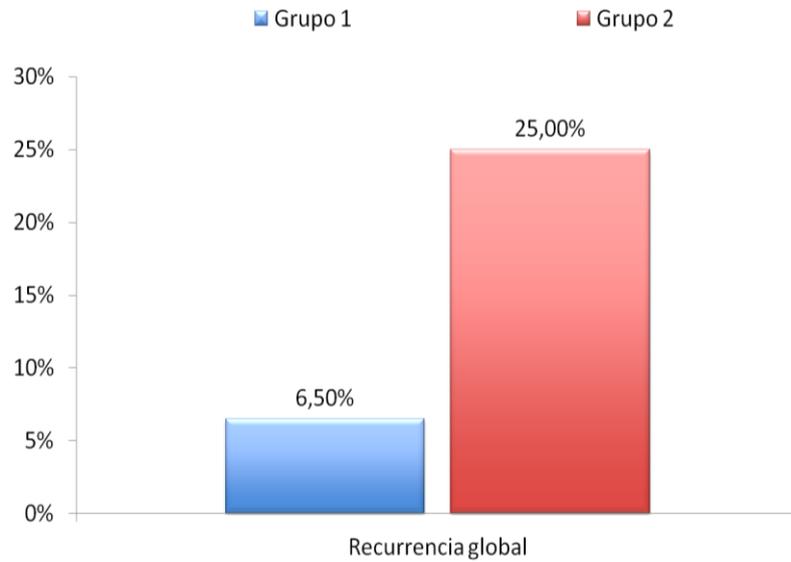


Figura 33: Tasa de recurrencia global según el número de parámetros presentados. Grupo 1: entre 0 y 2 variables; grupo 2: 3 o más. La tasa de recurrencias es significativamente más alta ($p < 0.01$) en el grupo que presenta 3 o más de los parámetros seleccionados.

Como se muestra en la siguiente curva de seguimiento en el tiempo, la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre ambos grupos y las curvas se separaron de forma precoz.

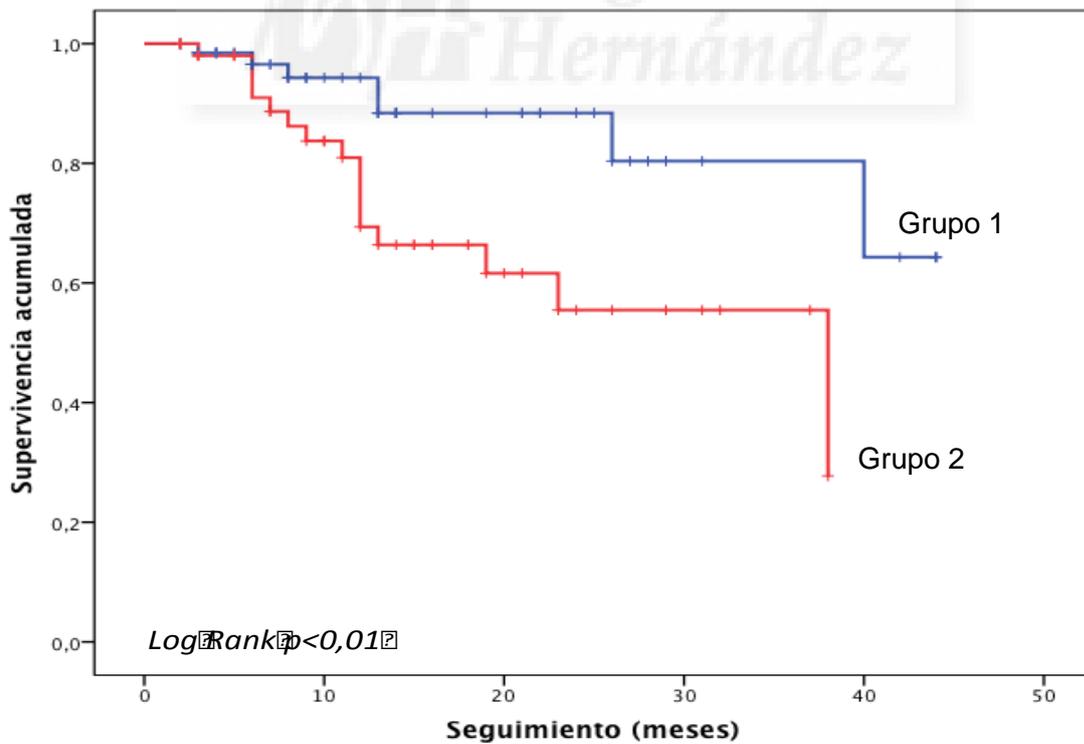


Figura 34: Curva de Kaplan-Meier mostrando las recurrencias globales de cada grupo durante el tiempo de seguimiento. "Supervivencia" significa no existencia de recurrencia.

En la siguiente imagen podemos comprobar los resultados en incidencia de recurrencia, dentro del grupo 2, según las combinaciones posibles de 3 ó más de los 6 parámetros analizados. Cada columna del gráfico se corresponde con la columna inmediatamente inferior de la tabla.

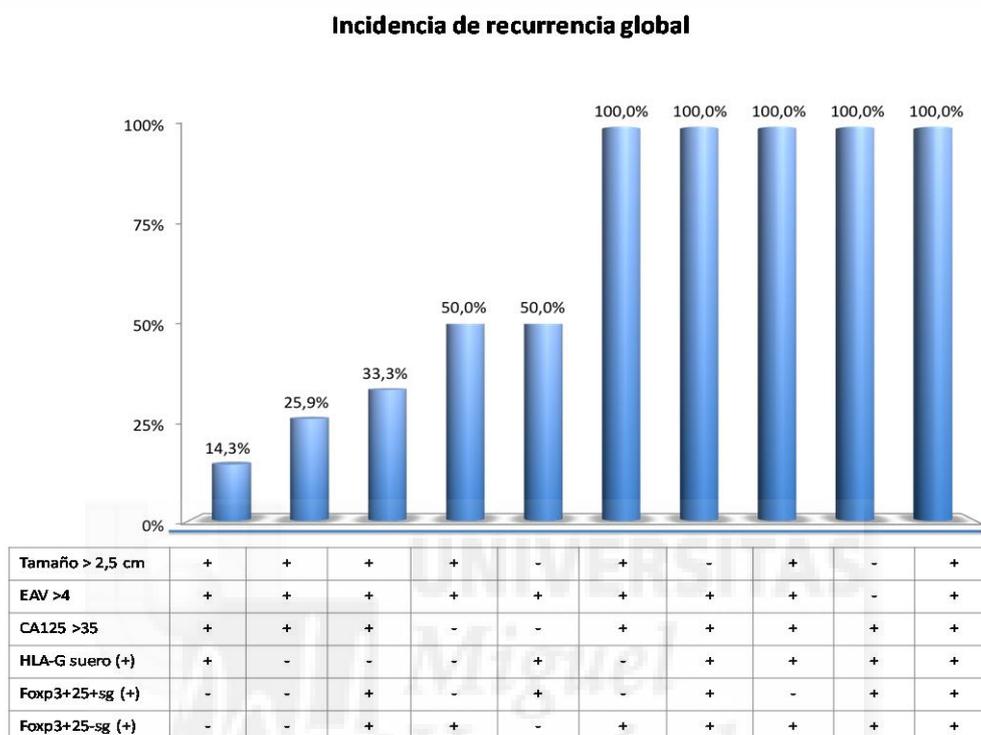


Figura 35: Combinaciones de 3 ó más parámetros para la incidencia de recurrencia observada en el grupo 2.

Hay que tener en cuenta que las pacientes de ambos grupos pueden presentar factores como esterilidad, antecedentes de tratamiento previo por endometriosis, y/o antecedentes familiares y personales de endometriosis, que pueden estar implicadas en la incidencia de recurrencias e interferir en los resultados. Para realizar un ajuste por variables se realizó un análisis multivariante mediante regresión de Cox en el que se incluyeron los 6 parámetros anteriores más los 4 factores mencionados, y mostró que las pacientes del grupo 2 tenían riesgo casi 3 veces superior de presentar recurrencias en comparación con el grupo 1 (HR: 2.80, IC 95% 1.05-7.47; $p < 0.05$).



DISCUSIÓN





1. CONSIDERACIONES GENERALES

La endometriosis es una enfermedad inflamatoria crónica, estrógeno-dependiente, cuya etiopatogenia no está bien establecida, pero probablemente haya una asociación de factores genéticos, medioambientales e inmunológicos.

La capacidad de los implantes endometriales de sobrevivir en localizaciones ectópicas, sugiere la existencia de una respuesta inmune deficiente, junto con alteraciones moleculares de las propias células endometriales que les confiere inmunosupervivencia.

Hay evidencias que demuestran un nivel elevado de macrófagos peritoneales activados así como de citocinas, con capacidad proinflamatoria y vasoreguladora. También se ha observado una activación anormal de linfocitos T y B, disminución de la actividad de células NK y producción de algunos anticuerpos como antiendometriales o antinucleares/antifosfolípido. A nivel molecular se han observado también alteraciones en las células endometrióticas que les confieren resistencia a la apoptosis o capacidad invasiva. Además se han observado alteraciones en mecanismos inmunosupresores como la expresión de la molécula HLA-G por las células endometrióticas o la alteración en las células Treg.

En base a estos antecedentes, nos planteamos estudiar diferentes mecanismos inmunosupresores en endometriosis, centrados en la expresión de HLA-G y de células Treg en diferentes muestras biológicas de estas pacientes. Para este análisis hemos incluido dos grupos de estudio: pacientes con quistes endometrióticos vs pacientes control con quistes anexiales de cualquier otra estirpe. Hasta el momento, los estudios publicados en relación a esta patología incluyen como grupos control pacientes libres de enfermedad con cavidad peritoneal normal (p.ej. por ligadura tubárica, etc). No hemos encontrado ninguno en el que se estudie como grupo control mujeres con patología quística anexial. El interés de este grupo está basado en determinar si, los cambios fisiopatológicos que puedan producirse como consecuencia de las alteraciones peritoneales/anexiales, podrían ser debidos o específicos de la endometriosis. Además, diferencias en los valores de HLA-G entre grupos, podrían ser útiles a la hora de realizar el diagnóstico pre-quirúrgico de una lesión quística ovárica, ayudando a reducir los posibles diagnósticos diferenciales.

Nuestra población de estudio es homogénea y comparable (en base a edad, sintomatología, no presencia de otra patología hormono-dependiente así como de patología crónica inflamatoria o autoinmune) a las poblaciones de estudio de los trabajos publicados al respecto. El análisis inicial entre los dos grupos de estudio del presente trabajo no presentó diferencias en las características básicas (edad, raza, parámetros analíticos básicos) no relacionadas con la patología. No se encontraron diferencias tampoco en los valores iniciales de estradiol, por lo tanto no hubo más influjo hormonal en un grupo que otro. Sí observamos diferencias significativas entre ambos grupos en los parámetros de EAV, marcador CA-125 y marcador CA-19.9 (39), que resultaron ser mayores como era esperable, en el grupo de endometriosis, tal y como está establecido.

En cuanto a los antecedentes personales de las pacientes, aproximadamente un 25% del grupo endometriosis había sido sometido ya a algún tipo de intervención quirúrgica por la patología. Aun así, fue mucho más elevado el número de cirugías conservadoras (laparotomía/laparoscopia) realizado y más bajo el de cirugías radicales.

La observación directa y la biopsia son el método diagnóstico gold-standar en endometriosis (39, 43). Fue en quirófano donde, con la confirmación posterior del estudio anatomopatológico, se clasificó la endometriosis como mínima, leve, moderada y severa. Como era de esperar el número de pacientes con endometriosis mínima y leve fue bajo, pues uno de los criterios de inclusión era la presencia de endometrioma mayor o igual a 2.5 cm. La detección de estos casos de endometriosis mínima o leve se produjo en el acto quirúrgico, y el motivo principal fue probablemente el considerar en el estudio ecográfico previo como quiste endometriósico una imagen correspondiente a un quiste simple.

Tras el análisis anatomopatológico se observó una frecuencia de atipia celular en endometriosis (endometriosis atípica) similar a la descrita en la literatura (118). Éstas presentaban sobreexpresión de la molécula p53. El gen supresor de tumores p53 juega un papel clave en el control del ciclo celular restringiendo la proliferación celular inapropiada. Mutaciones en la secuencia de este gen lleva a una producción alterada de la proteína que es más resistente a la degradación que la forma normal, acumulándose en el núcleo, por lo que es fácilmente detectable por inmunohistoquímica. En los casos de endometriosis normal o "benigna" no se detecta una sobreexpresión de p53. Ésta sí suele asociarse como hemos dicho, con

endometriosis atípica y con áreas de endometriosis asociadas a carcinomas ováricos (118, 119). A pesar de esto, hay que tener en cuenta que algunos casos de endometriosis normal puede presentar expresión positiva de p53, por lo que es importante distinguir la endometriosis atípica reactiva o atipia inflamatoria benigna, la cual no tiene importancia clínica y es causada por la propia inflamación o por tratamientos progestágenos, de la verdadera atipia preneoplásica, diagnosticada por presencia de atipia celular y/o hiperplasia epitelial.

2. CONSIDERACIONES SOBRE LA MOLÉCULA HLA-G

Aunque la endometriosis es una patología benigna, posee características de malignidad como resistencia a la apoptosis (132), invasión de tejidos (133) o secreción de la molécula HLA-G (134). La molécula HLA-G está implicada en mecanismos de tolerancia inmunológica debido a su efecto de inhibición de la actividad citotóxica de las células NK. Parece que también puede inhibir el desarrollo de células dendríticas maduras, al igual que la interacción de las APC HLA-G+ con los linfocitos T CD4 (160). El HLA-G se expresa de forma selectiva en algunos tipos de cáncer como el carcinoma hepatocelular (161), melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de endometrio, mesotelioma, carcinoma gástrico y tumores trofoblásticos (162). La expresión de esta molécula por las células tumorales permitiría escapar a la acción anti-tumoral de los linfocitos T y las células NK, relacionándose en algunos casos con un peor pronóstico clínico (136, 137). También se ha considerado un potencial marcador tumoral en el cáncer de ovario (162) con cierto valor pronóstico en esta patología y quizá un marcador de susceptibilidad del tumor a los diferentes agentes quimioterápicos, así como de monitorización de la quimioterapia (163). Además, HLA-G podría ser una diana potencial para una terapia basada en anticuerpos en pacientes con carcinoma gástrico (161).

Según estos datos, y por las características comunes a procesos malignos que posee la endometriosis, la secreción de esta molécula por parte del tejido endometriósico podría considerarse también un mecanismo de escape del sistema inmune que impediría que los implantes iniciales fueran eliminados y permitiría así el desarrollo y crecimiento de los mismos. Sin embargo, la detección de HLA-G en pacientes con endometriosis es controvertida. Hay estudios que no han conseguido confirmar su presencia (139), mientras que otros la han detectado en endometrio

eutópico en fase menstrual tanto en mujeres con endometriosis como en mujeres sanas (164), en LP (141) y en tejido endometriósico sin encontrarlo en endometrio eutópico de esas mismas pacientes (134). Por otro lado, un estudio del 2008 muestra expresión de HLA-G en endometrio eutópico y ectópico de mujeres con adenomiosis (aunque mostrando una mayor expresión en el tejido ectópico), no siendo así en el grupo control de mujeres sanas (165). No hemos encontrado trabajos sobre la determinación de esta molécula en LE.

Nuestros resultados muestran que la molécula HLA-G, en sus isoformas G1 y G5, es detectable en la mayor parte de las muestras de suero y LP de mujeres con endometriosis, así como en las muestras correspondientes a las pacientes del grupo control, con otro tipo de quistes benignos, tanto por técnica ELISA como por WB. De hecho, los valores de HLA-G en suero son mayores en las donantes o en los casos de no endometriosis que en los casos de endometriosis, aunque las medianas de los tres grupos prácticamente no difieren. *Eidukaite et al* ya observaron también mediante técnica ELISA una variabilidad en la expresión de esta molécula en el LP de mujeres con y sin endometriosis (siendo éstas sanas), siendo detectada en más del 50% de los casos pero sin diferencias entre grupos (141). En nuestros resultados en LP, aunque los niveles de HLA-G en endometriosis tienden a ser más altos, son similares a los detectados en mujeres con otros quistes. Es probable que un aumento en el número de casos control pusiera de manifiesto una diferencia significativa.

La molécula HLA-G tiene una expresión restringida de tejido pero ésta puede ser estimulada en tejidos que no la expresan a través de cambios inflamatorios. Considerando que la molécula HLA-G ha sido detectada en células sujetas a algún tipo de estrés o daño (166), su expresión en lesiones peritoneales puede ser debido a la reacción inflamatoria generada en la cavidad peritoneal. Sabemos que un gran pool de células T, macrófagos y células NK, se localizan tanto en el endometrio eutópico como en el ectópico en situaciones de inflamación y la activación de estas células implica la secreción de determinadas citocinas que pueden inducir la producción de HLA-G por parte de las células glandulares endometriales. También la expresión de HLA-G en endometrio menstrual puede reflejar el ambiente uterino estresante que se produce durante la menstruación. La presencia de HLA-G soluble en LP (141) puede deberse a su expresión por las células endometriales eutópicas en la fase menstrual, que son depositadas en la cavidad peritoneal por el proceso de menstruación retrógrada.

Aunque nuestros resultados señalan que la detección de HLA-G en suero y LP no es específica de endometriosis, puesto que también se detecta en suero y LP de pacientes con otro tipo de tumores ováricos benignos, sí existe una producción específica y localizada en el propio tejido endometriósico como demuestran la detección por WB y los altos niveles de HLA-G que hemos observado en el LE comparado con la apenas detectable cantidad en el líquido de otros quistes no endometriósicos, algo que hasta la fecha no se ha descrito. Mediante la técnica de WB, hemos confirmado la expresión de HLA-G tanto en el tejido endometrial ectópico como en el endometrio eutópico de las mismas pacientes. Las muestras analizadas se encontraban en la segunda fase de ciclo, lo que contrasta con otros estudios en los que no se detecta HLA-G en endometrio (139) o se detecta sólo en la fase menstrual (164). Hasta la fecha no hemos analizado ningún endometrio eutópico de pacientes control ya que no se dispone de muestras. El motivo es que para el estudio, este tejido se obtiene de la pieza uterina extraída al realizar cirugía radical o histerectomía, un tipo de cirugía frecuente en endometriosis pero que no suele realizarse en las pacientes que presentan la tipología de quiste que se ha considerado como control.

En los distintos estudios revisados, la detección de la molécula HLA-G se ha analizado mediante técnicas de inmunohistoquímica, ELISA y/o WB, aunque en ninguno de ellos determinan el tipo de isoforma de HLA-G. Hay casos en los que la molécula no se detecta mediante ELISA, pero sí mediante WB. Sin embargo, en los casos en los que no se ha detectado HLA-G por esta técnica, tampoco se ha detectado mediante ELISA. Por lo tanto, se obtiene mayor especificidad y sensibilidad con el WB, que es la técnica utilizada en los estudios en los que se detecta la molécula HLA-G en tejido o LP (160). Con el fin de lograr una aplicación clínica, sería necesario mejorar la sensibilidad del ELISA para la detección de HLA-G y comprobar la precisión de este método ampliando la muestra. De hecho, en el tratamiento del hepatocarcinoma, la expresión de HLA-G medida en suero mediante ELISA y en las lesiones malignas primarias mediante WB tiene un alto valor pronóstico, y se considera que los pacientes con expresión de la molécula en tejido hepático maligno tienen peor pronóstico, utilizando la detección de HLA-G como un marcador pronóstico útil (161).

Centrando el análisis en las pacientes con endometriosis, uno de los objetivos que aporta novedad al estudio es determinar si existe relación entre los valores de HLA-G y la clínica de la enfermedad, tanto a nivel de sintomatología y signos clínicos

iniciales previos a la intervención, como en características anatomopatológicas y la evolución observada en el tiempo.

Según la hipótesis inicial, altos niveles de HLA-G en estas pacientes podría indicar una endometriosis más resistente a la función del sistema inmune y por tanto, más activa, de mayor severidad, lo que podría traducirse en una sintomatología clínica más acusada. Sin embargo, los niveles de HLA-G detectados tanto en suero como en LP o LE no están relacionados con la sintomatología presentada por las pacientes y valorada según la EAV. De hecho, las pacientes que presentaron niveles no detectables de HLA-G tuvieron valores más altos de EAV. Sí se observa cierta asociación entre el tamaño del endometrioma y una mayor cantidad de HLA-G en el LP que puede ser debido a la reacción inflamatoria generada en la cavidad peritoneal, principalmente por la actividad aumentada de los macrófagos. También observamos que valores altos de CA-125 en suero se asocian con niveles más altos de HLA-G en LE, lo que sugiere una mayor expresión de esta molécula por parte de las células endometriales ectópicas que podría identificar lesiones más activas con mayor capacidad de crecimiento.

La endometriosis es una enfermedad hormonodependiente, por tanto su crecimiento y actividad viene determinada por las fluctuaciones hormonales de las diferentes fases del ciclo menstrual. En la bibliografía publicada sobre HLA-G y endometriosis, existen escasos estudios que describan si existen o no variaciones en los niveles de esta molécula en función de la fase del ciclo debido a esa característica fluctuante de la enfermedad, y los pocos datos aportados son controvertidos. Mientras que unos apuntan a que sólo es expresada en la fase menstrual (164), otros no encuentran variaciones en los niveles según las diferentes fases del ciclo menstrual (140). En este último estudio analizaron pacientes intervenidas por endometriosis o miomas frente a pacientes sin patología y observaron niveles en suero más altos en pacientes con leiomiomas respecto al grupo control o al grupo de endometriosis. Sin embargo, pacientes con endometriosis postmenopáusicas presentaban niveles de HLA-G comparables a los del grupo de postmenopausia con leiomiomas y significativamente mayores a los del grupo control de postmenopausia. Los autores concluyen que la molécula HLA-G en suero podría ser útil como marcador para evaluar el estado del microambiente donde se producen interacciones entre las células del sistema inmune y las células endometriales.

Nuestro estudio no incluye pacientes perimenopaúsicas. Los resultados muestran que los niveles de HLA-G en suero, LP y LE en pacientes con y sin endometriosis son similares en las diferentes fases del ciclo. Sin embargo, dentro del grupo de endometriosis, al relacionar estos valores con el grado de severidad observamos que durante la fase proliferativa, los valores de HLA-G en LP fueron notablemente mayores en endometriosis severa que en moderada, mientras que no hubo diferencia en la fase secretora. Escogiendo a las pacientes en fase secretora, observamos que los niveles eran significativamente más altos en endometriosis severa y moderada que en la clasificada como mínima.

Teniendo en cuenta las formas de presentación de la endometriosis (peritoneal, quística e infiltrante), observamos que los valores de HLA-G en LP fueron mayores en los casos de endometriosis infiltrante frente a la endometriosis quística o peritoneal en fase secretora, con una tendencia a ser también más altos en fase proliferativa. Así mismo, en los casos de ESRV, incluida en la endometriosis infiltrante, se vió que los niveles en LP también fueron más altos que en las pacientes sin este tipo de afectación. Por tanto, se observa cierta variación de los niveles de HLA-G en LP a lo largo del ciclo menstrual, principalmente en las formas de endometriosis infiltrante profunda. Estos resultados van en consonancia con los descritos por Mach *et al*, en los que el nivel de HLA-G en suero de mujeres con endometriosis infiltrante fluctúa según el momento del ciclo menstrual, siendo valores más altos que en los casos de endometriosis quística, en fase secretora. Estos valores observados en endometriosis infiltrante fueron similares a los observados en cáncer de ovario (167).

El aumento de los niveles de HLA-G en los casos de endometriosis infiltrante puede ser debido a la actividad incrementada de las enzimas metaloproteinasas en el microambiente de las lesiones endometriósicas, que se expresan en mayor cantidad en casos de endometriosis infiltrante que en endometriosis quística (168). Estas enzimas degradan la matriz celular de la superficie peritoneal, permitiendo así la infiltración del tejido y originando una reacción inflamatoria, con gran cantidad de infiltrados de macrófagos, que da lugar a una sintomatología muy acusada en estos casos y de difícil tratamiento.

La relación que se observa entre los niveles de HLA-G y la endometriosis infiltrante es un fenómeno similar al que se asocia con la producción de HLA-G por parte de las células del citotrofoblasto extraveloso de la placenta de forma temprana y mantenida en el embarazo (169). La función de esta molécula es la inducción de un

estado de tolerancia al feto semialogénico por el sistema inmunológico materno y permitir la invasión e implantación en el endometrio. Algunos investigadores han observado patrones de expresión de HLA-G aberrantes o disminuidos en complicaciones del embarazo como el aborto espontáneo, la pre-eclampsia o fallos de implantación en fecundación in vitro (170). Así mismo, los blastocistos que secretan HLA-G in vitro se asocian positivamente con una mayor tasa de implantación embrionaria (171).

La expresión de HLA-G también se ha descrito en diversos tipos de cáncer, y en algunos de ellos está asociada con un mal pronóstico de la enfermedad. La endometriosis es una enfermedad con cierto potencial de malignización a carcinoma ovárico, habitualmente asociado a la presencia de endometriosis atípica, que se caracteriza por la expresión del marcador tumoral p53. Por tanto, este tipo de endometriosis podría estar asociada a mayores niveles de HLA-G. No hemos encontrado estudios que comparen los niveles de HLA-G en endometriosis atípica vs típica, ni que analice las diferencias entre los valores de HLA-G según la expresión de la proteína p53. Nuestros datos muestran que los valores de HLA-G en suero y en LE tienden a ser más altos en las pacientes con endometriosis atípica, así como en las endometriosis, que sin mostrar atipia, son p53+. Las diferencias no resultaron significativas, probablemente debido al tamaño muestral. Un aumento en el número de casos permitiría establecer rangos de valores de HLA-G que determinen su asociación con la presencia de atipia y consecuentemente mejorar el diagnóstico y seguimiento clínico de estas pacientes.

3. CONSIDERACIONES SOBRE LAS CÉLULAS TREG Y CITOCINAS

Para funcionar adecuadamente, el sistema inmune debe discriminar entre lo propio y lo ajeno. Los linfocitos Treg suprimen la activación del sistema inmune una vez neutralizada la causa que lo originó, protegiendo así frente a la autorreactividad. La importante función que cumplen estos linfocitos se pone de manifiesto en las enfermedades autoinmunes que resultan cuando hay un defecto genético en las mismas. En endometriosis hay pocos estudios al respecto, y apuntan a una alteración de estas células, lo que justificaría su implicación en la patogenia y progresión de esta patología.

Las células Treg naturales (nTreg) poseen el fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ y tienen la capacidad de suprimir la actividad de las células T CD4+, las células dendríticas, las células T CD8+, las células NK, los monocito-macrófagos, los linfocitos B, los eosinófilos, los osteoblastos, los basófilos y los neutrófilos. Las células Treg inducibles se dividen en células reguladoras tipo 1 y en células Treg tipo TH3.

En este estudio, tras comparar las poblaciones iniciales en muestras de sangre, los valores de las células CD4+CD25+Foxp3- mostraron niveles más altos en los grupos endometriosis y control que en el grupo de donantes, lo que muestra un nivel de activación de linfocitos mayor en los grupos con lesiones quísticas sin función T reguladora. Un resultado similar se observó con la población celular CD4+Foxp3+, pero al estudiar los niveles de células con perfil Treg propiamente dicho no encontramos diferencias entre grupos. *Olkowska et al* describieron que los niveles de células Treg en sangre periférica y en LP no difieren entre el grupo control (mujeres sanas) y el grupo de pacientes con endometriosis quística (142). Su análisis fue más allá y dentro de la población de CD25+Foxp3+, identificaron 2 subpoblaciones: CD25^{high} y CD25^{low}. La subpoblación de células CD25^{high}Foxp3+ corresponde a las Treg (162-165) y sus niveles eran más bajos en sangre en el grupo de endometriosis que en el grupo control, lo que sugiere que la endometriosis está asociada con una alteración de los Treg circulantes.

En nuestros resultados, las diferencias más notables se observaron en la población celular CD4+CD25-Foxp3+, tanto en sangre como en LP. Sus valores fueron significativamente más altos en el grupo de endometriosis frente al grupo de donantes y además, tanto en el grupo de endometriosis como en el grupo control, esta población mostró valores más altos que la población Treg CD4+CD25+Foxp3+. De esto podemos deducir que en ambos grupos de pacientes existe un alto porcentaje de células con marcador Foxp3+ pero no están activadas, por lo tanto no ejercen su papel inmunoregulador y podría desencadenarse una respuesta inmune descompensada. Existen enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico en el que se describen altos niveles de células CD4+CD25-Foxp3+ asociadas al nivel de actividad de la enfermedad (172), es decir que la falta de activación de estas células para que desempeñen correctamente su función favorece los fenómenos autoinmunes.

A la vista de estos datos, probablemente el aumento de las células Treg en la cavidad peritoneal en pacientes con endometriosis no sólo sea debido al paso de las mismas desde la sangre (traslocación activa), sino también a su inducción a nivel

local. Esta inducción puede ser mediada por citocinas tales como TGF- β e IL-10 (165, 166). Esta teoría puede sostenerse ante la detección de la subpoblación de linfocitos CD25^{low}Foxp3+ en LP de pacientes con endometriosis, ya que pueden representar células Treg en vías de inducción a partir del tipo *naive* (173). El predominio de la población CD4+CD25-Foxp3+ podría tener una explicación similar, tratándose de células que no logran ser inducidas a células Treg activas.

En condiciones fisiológicas, las células Treg (174, 175) son estimuladas por IL-2 y TGF- β e inhibidas por citocinas inflamatorias (176, 177). Algunos estudios apuntan a que las Treg sólo utilizan la IL-2 para salir de su estado anérgico y activarse, y no como mecanismo de supresión de los linfocitos TH (176, 177). En cuanto al TGF- β , aunque hay estudios que han mostrado que puede no ser esencial en la función supresora de las Treg, se ha visto que participa en la inducción de la expresión de Foxp3 y de esta manera en el mantenimiento y la inducción de las células Treg a partir de las células T *naive*. (146).

La inducción de Treg también puede ser mediada por citocinas como IL-10 (165, 166), aunque su participación en la función de las Treg está sujeta a controversia, ya que existen estudios que muestran que la capacidad reguladora de estas células es independiente de esta citocina (176, 177). Con esto podemos suponer que la IL-10 juega un papel importante en algunos subtipos de células Treg o en algún tejido específico pero no es esencial para su función.

El microambiente peritoneal en mujeres con endometriosis difiere del de mujeres sanas. En endometriosis se han detectado niveles aumentados de IL-10 y TGF- β en LP (92, 178). El grupo de *Podgaec* (179) estudió y comparó poblaciones de mujeres con endometriosis frente a mujeres sanas, concluyendo que las concentraciones de TGF- β en LP eran más elevadas en mujeres con endometriosis, pero los valores eran similares para las concentraciones de IL-10. Nuestros resultados son acordes con estas conclusiones: no observamos diferencias entre grupos en los valores de IL-10, tanto en sangre como en LP (aunque en LP los niveles son visiblemente mayores). Respecto a los niveles de TGF- β , aunque no se detectaron diferencias, las medias son superiores en pacientes con endometriosis, principalmente en LP. Los valores bajos y en algunos casos indetectables de las citocinas TGF- β y principalmente IL-10 observados en nuestros resultados podría justificar que los linfocitos CD4+CD25-Foxp3+ sean más abundantes que los CD4+CD25+Foxp3+. Sin embargo, no encontramos asociación entre estas variables. Además, aunque los

valores de estas citocinas tienden a ser más altos en las pacientes con endometriosis, los niveles de ambas poblaciones celulares son similares entre ambos grupos de pacientes, por lo que no se puede determinar que esta alteración en la población de células Treg esté asociada al desarrollo de la endometriosis. Se debería aumentar el número de casos analizados para establecer conclusiones más firmes.

Hemos comentado que el HLA-G es una molécula clase I no clásica del CMH que adopta siete isoformas, cuatro se encuentran ligadas a la membrana (G1-G4) y las otras tres formas son solubles (G5-G7). Se ha demostrado que HLA-G5, una isoforma soluble secretada por células madre mesenquimales, puede suprimir la función de las células NK e inducir la proliferación de células Treg CD4+CD25^{high}Foxp3+. Esta secreción de HLA-G5 parece ser IL-10 dependiente (180). En nuestros resultados, sin embargo, no observamos correlación entre los valores de HLA-G y los niveles de células Treg detectados.

Los estudios revisados hasta la fecha incluyen pacientes con implantes peritoneales o con endometriomas ováricos, pero ninguno de ellos analiza una posible correlación entre los niveles de células Treg y los grados de severidad de la endometriosis. Nuestros resultados muestran que la subpoblación de células CD4+CD25-Foxp3+ es más elevada en sangre en los casos más severos, sin que haya asociación con la forma de presentación de la endometriosis. También los niveles de CD4+CD25+ más altos en endometriosis quística nos muestran una mayor activación linfocitaria ante una mayor afectación genital.

Según la fase del ciclo en la que se encontraran las pacientes con endometriosis en el momento de la obtención de las muestras, nuestro análisis muestra que, en fase secretora, tanto en sangre como en LP, existe un nivel más alto de células Treg. En LP hay un aumento también en esta fase de células CD4+ totales, pero éstas incluyen tanto las Treg como las CD25-. *Basta et al.* detectaron la presencia de células Treg en muestras de tejido endometrial en fase secretora de pacientes sanas y en tejido endometriósico (144). *Berbic et al.* observaron que en pacientes con endometriosis las células Treg presentan alteraciones significativas: la cantidad de células Foxp3+ en endometrio eutópico permanecen elevadas durante la fase secretora del ciclo, cosa que no sucede en pacientes sanas (143). Se atribuye esta falta de disminución de las mismas al incremento de antígenos endometriales y a la producción continua de estrógeno local (181). En fase menstrual detectaron una disminución en la cuantía de células Foxp3+, pero el incremento previo de las mismas

podría producir un efecto inmunosupresor sobre el resto de células del sistema inmune presentes en el endometrio, lo que permitiría que los antígenos endometriales escapen a la acción del sistema inmune y asienten en focos ectópicos. Este grupo propone que el cúmulo de antígenos endometriales, junto con la producción estrogénica local y factores angiogénicos, producen un efecto feedback positivo que asegura la expresión continua de Foxp3 en endometriosis.

Por tanto, inicialmente, niveles altos de células Treg parece que permitirían la diseminación e implantación de las células endometriales en lugares ectópicos. Al alcanzar la cavidad y estar expuestas al medio peritoneal, las alteraciones moleculares intrínsecas que presentan estas células y que les confiere cierta predisposición genética permitirían el desarrollo de los implantes endometriósicos. Como consecuencia, la respuesta inflamatoria que se origina produce citocinas y factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis y la expresión local de aromatasa, favoreciendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas. En nuestros datos, encontramos una correlación positiva entre los valores de TGF- β en suero y la sintomatología referida por las pacientes. En estadios más avanzados de endometriosis, la clínica se acentúa; el TGF- β puede actuar en el desarrollo de los estadios evolutivos de la endometriosis a través de la diseminación y mantenimiento de las células endometriales, adhesión e invasión del peritoneo, angiogénesis, proliferación de tejido y fibrosis (178). El crecimiento de la lesión llevaría a un aumento en la síntesis de HLA-G, inhibiendo a las células citotóxicas del sistema inmunológico. Los macrófagos y linfocitos CD4+ con funciones celulares alteradas no logran eliminar los implantes, lo que da lugar a una expresión continua de Foxp3 pero sin activación de la función inmunosupresora, desarrollándose una respuesta inflamatoria crónica que podría llevar a la aparición de fenómenos autoinmunes. De hecho, en mujeres con endometriosis existe una producción de auto-anticuerpos no específicos que también están presentes en mujeres con fallo reproductivo como esterilidad o aborto recurrente, lo que podría explicar la esterilidad en pacientes con endometriosis (182). Otros autores han descrito anticuerpos antiendometriales presentes únicamente en el suero de mujeres con endometriosis que parecen reconocer también los implantes endometriósicos (183).

4. CONSIDERACIONES SOBRE RECURRENCIAS

El seguimiento de las pacientes se realizó durante al menos un año, con controles aproximadamente cada 6 meses con el objetivo de valorar la evolución clínica y la aparición de recurrencias. A partir del año, el número de pacientes revisadas descendió casi a la mitad. Las pérdidas se generaron por alta de la paciente o por no asistencia a la consulta.

La tasa de recurrencia observada al año aproximadamente fue del 13.8%. Esta tasa de recurrencia es alta pero comparable con la descrita en la literatura reciente (184). La sintomatología fue el parámetro que presentó menor tiempo de recurrencia, seguido del marcador CA-125 y posteriormente los endometriomas.

Respecto a los valores de HLA-G, observamos una correlación positiva entre los valores observados en suero y LP con el tiempo en el que se observó recurrencia de los síntomas de las pacientes, de forma que a mayor nivel de HLA-G, mayor es el intervalo libre de enfermedad de la paciente. A pesar de observarse niveles más altos de HLA-G en casos de atipia, este resultado es contrario al observado en algunos tipos de cáncer en los que la molécula es marcador de mal pronóstico clínico (136,137). Como hemos comentado previamente y según nuestros resultados, la molécula HLA-G no parece ser un marcador específico de endometriosis a nivel sistémico, por lo que su asociación con el pronóstico de la enfermedad no es concluyente.

Respecto a las poblaciones celulares, se observó una correlación positiva entre los niveles de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ en sangre y el tiempo hasta recurrencias de endometriomas y del marcador CA-125. Estos linfocitos podrían asociarse a formas de endometriosis menos activas o agresivas, en las que el sistema inmunológico es capaz de contener su progresión, y en las que las células Treg desempeñan su función inmunosupresora para evitar una respuesta inflamatoria innecesaria. Habría que aumentar el número de casos analizados para intentar establecer rangos de valores que permitieran determinar un pronóstico clínico más preciso.

Para el análisis del riesgo de recurrencia seleccionamos los parámetros que consideramos pudieran tener más relación con la endometriosis y con un valor pronóstico en cuanto a su evolución. Nos fijamos sobre todo en los parámetros clínicos

iniciales (EAV, tamaño de endometrioma y CA-125), puesto que habíamos obtenido diferencias muy notables entre los grupos endometriosis y control. Además, seleccionamos la variable de HLA-G en suero por haber encontrado diferencias entre grupos y por tratarse de una molécula de fácil medición que podría ser de utilidad como marcador predictivo de recurrencias. También consideramos para el análisis las variables de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ y CD4+CD25-Foxp3+ en sangre como posibles factores pronóstico e igualmente de fácil medición.

Independientemente de que cada parámetro por sí mismo presentara asociación o no a una mayor tasa de recurrencia de endometriosis, según los valores establecidos, comprobamos que la suma o la presencia de 3 ó más de estos parámetros aumentaba la tasa de recurrencia de endometriosis. Este hallazgo confiere a estos parámetros valor predictivo sobre las recurrencias de la enfermedad.

La agrupación de las pacientes según sumaran 3 ó más factores por un lado, o menos de tres por otro, permitió estimar la probabilidad de supervivencia de cada grupo en un determinado tiempo, considerando "supervivencia" el tiempo en el que no se había observado recurrencia. Las pacientes con menos de tres factores con valores por encima de la mediana mostraron una supervivencia mayor que las pacientes que presentaron 3 ó más de los parámetros seleccionados, indicando que en ellas se produce una recurrencia temprana.

Finalmente quisimos eliminar posibles factores que pudieran alterar los resultados, como los antecedentes familiares y personales de endometriosis, los tratamientos previos por endometriosis y esterilidad conocida, para determinar el riesgo real de recurrencia. Teniendo en cuenta la presencia de cada uno de ellos, observamos que las pacientes con 3 ó más de los parámetros anteriores tienen un riesgo casi 3 veces superior de presentar recurrencias en comparación con el grupo que sólo presenta menos de tres factores con valores por encima de la mediana. Se podría entonces considerar que la suma de estos factores en una paciente, con valores por encima de los determinados, predice un peor pronóstico clínico que el de aquella paciente con sólo alguno de estos parámetros alterado.

CONCLUSIONES





- La detección de la molécula de HLA-G en suero y LP no es específica de endometriosis. Esta molécula está presente en suero, LP, LE y LQ tanto en pacientes con endometriosis como en mujeres con quistes no endometriósicos. Sin embargo, existe un cierto porcentaje de pacientes en ambos grupos en las que no se detecta HLA-G en suero o LP. Las isoformas estudiadas corresponden a G1 y G5.
- La molécula HLA-G se expresa en endometrio eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis, lo que se confirma con los altos valores detectados en el LE respecto al líquido de otros quistes. Las isoformas analizadas son G1 y G5.
- Los niveles de HLA-G detectados tanto en suero como en LP o LE no están relacionados con la sintomatología presentada por las pacientes, aunque existe cierta relación con el tamaño del endometrioma y los niveles de CA-125. El diagnóstico de endometriosis atípica y la expresión de p53 parece estar relacionado con niveles mayores de HLA-G.
- Los niveles de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) son similares en sangre y en LP tanto pacientes con endometriosis como en el grupo control. Sin embargo, los valores de CD4+CD25-Foxp3+ son mayores que los de las células Treg, siendo más elevados en sangre en los casos de endometriosis más severos. No se observa correlación entre los porcentajes de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ y CD4+CD25-Foxp3+ y los niveles de citocinas IL-10 y TGF- β .
- Los niveles de HLA-G y de células Treg varían a lo largo del ciclo menstrual, siendo más elevados en fase secretora.
- Los niveles de HLA-G en LP así como los de células Treg en sangre y LP, son mayores en los casos de endometriosis infiltrante.
- El riesgo de recurrencias en endometriosis no aumenta cuando se consideran parámetros clínicos o moleculares de forma independiente. Sin embargo, sí se observa un claro aumento del riesgo cuando concurren varios de estos parámetros.



BIBLIOGRAFÍA





1. Gallart T, Vives J. El sistema inmunitario como dispositivo específico y adaptativo de resistencia anti-infecciosa. Farreras P, Rozman C. Medicina interna. Barcelona: Ediciones Doyma 1992:2592-4.
2. Regueiro JR, López LC. Inmunología: Biología y patología del Sistema Inmune, 2ª ed. Ed.Médica Panamericana 1997:61-7.
3. Carbone FR, Bevan MJ. Major histocompatibility control of T cells recognition. Paul WE. Fundamental Immunology. New York: Raven Press 1989:541-70.
4. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev 2001;182:207-14.
5. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. Int Immunol 2007;19(4):345-54.
6. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. Trends Mol Med 2007;13(3):108-16.
7. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P, et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. Curr Opin Immunol 1995;7(2):214-27.
8. Pleiman CM, D'Ambrosio D, Cambier JC. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. Immunol Today 1994;15(9):393-9.
9. Clark EA, Lane PJ. Regulation of human B-cell activation and adhesion. Annu Rev Immunol 1991;9:97-127.
10. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. Annu Rev Immunol 1996;14:619-48.
11. Johnston RB, Jr. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. N Engl J Med 1988;318(12):747-52.
12. Neil Barclay A, Birkeland M, Brown M. The leucocyte antigen Facts Book, 2ª ed. Arcad Press 1997:22-3.
13. Miceli MC, Parnes JR. Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Adv Immunol 1993;53:59-122.
14. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. Cell 1992;71(7):1065-8.
15. Schlossman SF. Leukocyte Typing V. Oxford University Press, Oxford 1995:1612-3.
16. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. Annu Rev Immunol 1993;11:403-50.

17. Jorgensen JL, Reay PA, Ehrich EW, Davis MM. Molecular components of T-cell recognition. *Annu Rev Immunol* 1992;10:835-73.
18. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988;332(6167):845-50.
19. Malek TR, Chan C, Glimcher LH, Germain RN, Shevach EM. Influence of accessory cell and T cell surface antigens on mitogen-induced IL 2 receptor expression. *J Immunol* 1985;135(3):1826-33.
20. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329(6139):512-8.
21. Yewdell JW, Bennink JR. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv Immunol* 1992;52:1-123.
22. Banchereau J, Rousset F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Adv Immunol* 1992;52:125-262.
23. Vitetta ES, Fernandez-Botran R, Myers CD, Sanders VM. Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv Immunol* 1989;45:1-105.
24. Ochs HD, Hollenbaugh D, Aruffo A. The role of CD40L (gp39)/CD40 in T/B cell interaction and primary immunodeficiency. *Semin Immunol* 1994;6(5):337-41.
25. Dinarello CA, Mier JW. Lymphokines. *N Engl J Med* 1987;317(15):940-5.
26. Oppenheim JJ, Rossio J, Gearing A. The clinical applications of cytokines: role in pathogenesis, diagnosis and therapy. Oxford University Press 1993.
27. Thompson A. The Cytokine Handbook. Academic Press 2003:3-18.
28. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990;59:783-836.
29. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I. Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982;128(5):2177-82.
30. Gallart T, Vives J. Interleucinas y otras citocinas. Farreras P, Rozman C. *Medicina interna*. Farreras. Barcelona: Ediciones Doyma 1992:2650-1.
31. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990;8:303-33.
32. Male D, Champion B, Cooke A. Tolerance and autoimmunity. *Advanced immunology*. London, new York: Gower 1987.

33. Boehmer VH, Teh HS, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* 1989;10(2):57-61.
34. Mak T, Saunders M. Autoimmunity disease. The immune response: basic and clinical principles. Academic Press 2005:964-9.
35. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49(2):273-80.
36. Campbell IG, Thomas EJ. Endometriosis: candidate genes. *Hum Reprod Update* 2001;7(1):15-20.
37. Attaran M, Falcone T, Goldberg J. Endometriosis: still tough to diagnose and treat. *Cleve Clin J Med* 2002;69(8):647-53.
38. Ares N, Contreras DM, Cantero O, González T. Endometriosis urogenital. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 1998:151-5.
39. Acién P. Endometriosis. *Tratado de Obstetricia y Ginecología. Ginecología. Ed. Molly* 2004:620-90..
40. Álvarez T, González L, Escribano N, Yagüe JL, Reyes Y, López JA. Endometriosis y diverticulosis apendicular: a propósito de un caso. *Rev Esp Patol* 2002;35(2):217-220.
41. Bischoff F, Simpson JL. Genetic basis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:284-99.
42. Barlow DH, Kennedy S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu Rev Med* 2005;56:345-56.
43. Yap C, Furness S, Farquhar C. Pre and post-operative medical therapy for endometriosis surgery. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004;(3):CD003678.
44. Celik M, Bülbüloglu E, Büyükbese MA, Cetinkaya A. Abdominal wall endometrioma. Localizing in rectus abdominal sheath. *Turk J Med Sci* 2004;34:341-3.
45. Kaya H, Sezik M, Ozkaya O, Sahiner H, Ozbasar D. Does the diameter of an endometrioma predict the extent of pelvic adhesions associated with endometriosis? *J Reprod Med* 2005;50(3):198-202.
46. Koninckx PR, Martin DC. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertil Steril* 1992;58(5):924-8.
47. Llewellyn-Jones D. *Ginecología y Obstetricia. Harcourt Brace and Company - Elsevier* 200:275.
48. Koninckx PR, Oosterlynck D, D'Hooghe T, Meuleman C. Deeply infiltrating endometriosis is a disease whereas mild endometriosis could be considered a non-disease. *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:333-41.

49. Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 1999;42(3):566-85.
50. Sampson J. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
51. Story L, Kennedy S. Etiology of endometriosis. *Modern management of endometriosis* 2006. New York: Taylor and Francis.
52. Fanton JW, Golden JG. Radiation-induced endometriosis in *Macaca mulatta*. *Radiat Res* 1991;126(2):141-6.
53. D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, De J, I, Hill JA, Koninckx PR. The effects of immunosuppression on development and progression of endometriosis in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril* 1995;64(1):172-8.
54. Kubicka U, Olszewski WL, Tarnowski W, Bielecki K, Ziolkowska A, Wierzbicki Z. Normal human immune peritoneal cells: subpopulations and functional characteristics. *Scand J Immunol* 1996;44(2):157-63.
55. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Lacquet FA, Waer M, Koninckx PR. Flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994;31(1):25-31.
56. Barcz E, Rozewska ES, Kaminski P, Demkow U, Bobrowska K, Marianowski L. Angiogenic activity and IL-8 concentrations in peritoneal fluid and sera in endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;79(3):229-35.
57. Gazvani MR, Christmas S, Quenby S, Kirwan J, Johnson PM, Kingsland CR. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to stage of disease. *Hum Reprod* 1998;13(7):1957-61.
58. Mori H, Sawairi M, Nakagawa M, Itoh N, Wada K, Tamaya T. Peritoneal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease. *Am J Reprod Immunol* 1991;26(2):62-7.
59. Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M. Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167(1):265-70.
60. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11(1):220-3.
61. Akoum A, Lawson C, McColl S, Villeneuve M. Ectopic endometrial cells express high concentrations of interleukin (IL)-8 in vivo regardless of the menstrual cycle phase and respond to oestradiol by up-regulating IL-1-induced IL-8 expression in vitro. *Mol Hum Reprod* 2001;7(9):859-66.

62. Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski WP. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1996;65(5):925-30.
63. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996;98(2):482-9.
64. Szylo K, Tchorzewski H, Banasik M, Glowacka E, Lewkowicz P, Kamber-Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm* 2003;12(3):131-8.
65. Ho HN, Wu MY, Chao KH, Chen CD, Chen SU, Yang YS. Peritoneal interleukin-10 increases with decrease in activated CD4+ T lymphocytes in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997;12(11):2528-33.
66. Wu MY, Chao KH, Chen SU, Chen HF, Yang YS, Huang SC, et al. The suppression of peritoneal cellular immunity in women with endometriosis could be restored after gonadotropin releasing hormone agonist treatment. *Am J Reprod Immunol* 1996;35(6):510-6.
67. Ho HN, Wu MY, Chao KH, Chen CD, Chen SU, Chen HF, et al. Decrease in interferon gamma production and impairment of T-lymphocyte proliferation in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(5):1236-41.
68. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991;56(1):45-51.
69. Vigano P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1991;56(5):894-9.
70. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992;58(2):290-5.
71. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Muzzioli M, Di SG, Fabris N. Natural killer activity in stage III and IV endometriosis: impaired cytotoxicity and retained lymphokine responsiveness of natural killer cells. *Gynecol Endocrinol* 1995;9(2):125-30.
72. Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* 1994;62(5):1086-8.
73. Wu MY, Yang JH, Chao KH, Hwang JL, Yang YS, Ho HN. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000;74(6):1187-91.

74. Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167(1):257-61.
75. Tanaka E, Sendo F, Kawagoe S, Hiroi M. Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1992;34(1):27-30.
76. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1993;82(2):206-12.
77. Semino C, Semino A, Pietra G, Mingari MC, Barocci S, Venturini PL, et al. Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril* 1995;64(5):909-16.
78. Hirata J, Kikuchi Y, Imaizumi E, Tode T, Nagata I. Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37(1):43-7.
79. Becker JL, Widen RH, Mahan CS, Yeko TR, Parsons AK, Spellacy WN. Human peritoneal macrophage and T lymphocyte populations in mild and severe endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1995;34(3):179-87.
80. Halme J, Becker S, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148(1):85-90.
81. Braun DP, Gebel H, Rana N, Dmowski WP. Cytolysis of eutopic and ectopic endometrial cells by peripheral blood monocytes and peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998;69(6):1103-8.
82. Kusume T, Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Hayashi K, Oguri H, et al. Human leukocyte antigen expression by peritoneal macrophages from women with pelvic endometriosis is depressed but coordinated with costimulatory molecule expression. *Fertil Steril* 2005;83 Suppl 1:1232-40.
83. Lee KS, Baek DW, Kim KH, Shin BS, Lee DH, Kim JW, et al. IL-10-dependent down-regulation of MHC class II expression level on monocytes by peritoneal fluid from endometriosis patients. *Int Immunopharmacol* 2005;5(12):1699-712.
84. Jones RK, Bulmer JN, Searle RF. Phenotypic and functional studies of leukocytes in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4(5):702-9.
85. Jones RK, Bulmer JN, Searle RF. Immunohistochemical characterization of stromal leukocytes in ovarian endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal endometrium. *Fertil Steril* 1996;66(1):81-9.
86. Witz CA, Montoya IA, Dey TD, Schenken RS. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994;32(3):173-9.

87. Gomez-Torres MJ, Acien P, Campos A, Velasco I. Embryotoxicity of peritoneal fluid in women with endometriosis. Its relation with cytokines and lymphocyte populations. *Hum Reprod* 2002;17(3):777-81.
88. Odukoya OA, Ajjan R, Lim K, Watson PF, Weetman AP, Cooke ID. The pattern of cytokine mRNA expression in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod* 1997;3(5):393-7.
89. Schroder W, Gaetje R, Baumann R. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in peritoneal fluid and serum of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1996;23(1):10-4.
90. Pizzo A, Salmeri FM, Ardita FV, Sofo V, Tripepi M, Marsico S. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2002;54(2):82-7.
91. Sueldo CE, Kelly E, Montoro L, Subias E, Baccaro M, Swanson JA, et al. Effect of interleukin-1 on gamete interaction and mouse embryo development. *J Reprod Med* 1990;35(9):868-72.
92. Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(5):1522-6.
93. Morcos RN, Gibbons WE, Findley WE. Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1985;44(5):678-83.
94. Prough SG, Aksel S, Gilmore SM, Yeoman RR. Peritoneal fluid fractions from patients with endometriosis do not promote two-cell mouse embryo growth. *Fertil Steril* 1990;54(5):927-30.
95. Sueldo CE, Lambert H, Steinleitner A, Rathwick G, Swanson J. The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on murine sperm-oocyte interaction. *Fertil Steril* 1987;48(4):697-9.
96. Suginami H, Yano K. An ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid: an OCI-related membrane responsible for fimbrial failure of ovum capture. *Fertil Steril* 1988;50(4):648-53.
97. Velasco I, Acien P, Campos A, Acien MI, Ruiz-Macia E. Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *J Reprod Immunol* 2010;84(2):199-205.
98. Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1997;67(6):1059-64.
99. McLaren J, Dealtry G, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Decreased levels of the potent regulator of monocyte/macrophage activation, interleukin-13, in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 1997;12(6):1307-10.

100. Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A, Koumantakis G, Vassiliadis S, Selam B, et al. Increased levels of interleukin-15 in the peritoneal fluid of women with endometriosis: inverse correlation with stage and depth of invasion. *Hum Reprod* 2003;18(2):429-32.
101. Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A, Koumantakis G, Vassiliadis S, Mahutte NG. Altered expression of interleukin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2003;80(4):889-94.
102. Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 1980;23(3):885-93.
103. Wild RA, Shivers CA. Antiendometrial antibodies in patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;8(3):84-6.
104. Chihal HJ, Mathur S, Holtz GL, Williamson HO. An endometrial antibody assay in the clinical diagnosis and management of endometriosis. *Fertil Steril* 1986;46(3):408-11.
105. Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E, Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 1987;70(1):115-22.
106. Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E, Friberg J. Reproductive failure because of autoantibodies: unexplained infertility and pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160(6):1376-80.
107. Confino E, Harlow L, Gleicher N. Peritoneal fluid and serum autoantibody levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1990;53(2):242-5.
108. Inagaki J, Sugiura-Ogasawara M, Nomizu M, Nakatsuka M, Ikuta K, Suzuki N, et al. An association of IgG anti-laminin-1 autoantibodies with endometriosis in infertile patients. *Hum Reprod* 2003;18(3):544-9.
109. Mathur S, Chihal HJ, Homm RJ, Garza DE, Rust PF, Williamson HO. Endometrial antigens involved in the autoimmunity of endometriosis. *Fertil Steril* 1988;50(6):860-3.
110. Rajkumar K, Malliah V, Simpson CW. Identifying the presence of antibodies against endometrial antigens. A preliminary study. *J Reprod Med* 1992;37(6):552-6.
111. Mathur S, Butler WJ, Chihal HJ, Isaacson KB, Gleicher N. Target antigen(s) in endometrial autoimmunity of endometriosis. *Autoimmunity* 1995;20(4):211-22.
112. Kim JG, Kim CW, Moon SY, Chang YS, Lee JY. Detection of antiendometrial antibodies in sera of patients with endometriosis by dual-colored, double-labeling immunohistochemical method and western blot. *Am J Reprod Immunol* 1995;34(2):80-7.
113. Switchenko AC, Kauffman RS, Becker M. Are there antiendometrial antibodies in sera of women with endometriosis? *Fertil Steril* 1991;56(2):235-41.

114. Odukoya OA, Wheatcroft N, Weetman AP, Cooke ID. The prevalence of endometrial immunoglobulin G antibodies in patients with endometriosis. *Hum Reprod* 1995;10(5):1214-9.
115. Nothnick WB, Curry TE, Jr., Muse KN, London SN, Vernon MW. Detection of a unique 32-kd protein in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1994;61(2):288-93.
116. Garza D, Mathur S, Dowd MM, Smith LF, Williamson HO. Antigenic differences between the endometrium of women with and without endometriosis. *J Reprod Med* 1991;36(3):177-82.
117. Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998;13(12):3496-502.
118. Sainz dIC, Izquierdo M, Canamero M, Granizo JJ, Manzarbeitia F. Increased prevalence of p53 overexpression from typical endometriosis to atypical endometriosis and ovarian cancer associated with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113(1):87-93.
119. Nezhat F, Cohen C, Rahaman J, Gretz H, Cole P, Kalir T. Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts. *Cancer* 2002;94(11):2935-40.
120. Ación P, Velasco I, Ación M, Capello C, Vela P. Epithelial Ovarian Cancers and Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2015;74(2):126-35.
121. Winfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers P. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1995;64(2):340-46.
122. Healy DL, Rogers P, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4(5):736-40.
123. Sillem N, Prifti S, Neher M, Runnebaum B. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5):730-5.
124. Hudelist G, Lass H, Keckstein J, walter I, Wieser F, Wenzl R, et al. Interleukin 1alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20(6):1695-701.
125. Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994;94(3):946-53.
126. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1997;68(5):912-9.

127. Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(1):174-9.
128. Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, et al. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 1997;57(3):514-9.
129. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, et al. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(12):4474-80.
130. Velasco I, Rueda J, Acien P. Aromatase expression in endometriotic tissues and cell cultures of patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2006;12(6):377-81.
131. Bergqvist A, Bruse C, Carlberg M, Carlstrom K. Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril* 2001;75(3):489-95.
132. Zhang H, Li M, Zheng X, Sun Y, Wen Z, Zhao X. Endometriotic stromal cells lose the ability to regulate cell-survival signaling in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 2009;15(10):653-63.
133. Pitsos M, Kanakas N. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2009;16(8):717-26.
134. Barrier BF, Kendall BS, Ryan CE, Sharpe-Timms KL. HLA-G is expressed by the glandular epithelium of peritoneal endometriosis but not in eutopic endometrium. *Hum Reprod* 2006;21(4):864-9.
135. Fanchin R, Gallot V, Rouas-Freiss N, Frydman R, Carosella ED. Implication of HLA-G in human embryo implantation. *Hum Immunol* 2007;68(4):259-63.
136. Jung YW, Kim YT, Kim SW, Kim S, Kim JH, Cho NH, et al. Correlation of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression and disease progression in epithelial ovarian cancer. *Reprod Sci* 2009;16(11):1103-11.
137. Lin A, Chen HX, Zhu CC, Zhang X, Xu HH, Zhang JG, et al. Aberrant human leucocyte antigen-G expression and its clinical relevance in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 2010;14(8):2162-71.
138. Somigliana E, Vignani P, Vignali M. Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? *Hum Reprod Update* 1999;5(1):40-51.
139. Hormung D, Fujii E, Lim KH, Vigne JL, McMaster MT, Taylor RN. Histocompatibility leukocyte antigen-G is not expressed by endometriosis or endometrial tissue. *Fertil Steril* 2001;75(4):814-7.
140. Basta P, Mach P, Pitynski K, Bednarek W, Klimek M, Zietek J, et al. Differences in the blood serum levels of soluble HLA-G concentrations between the menstrual

cycle phases and menopause in patients with ovarian endometriosis and uterine leiomyoma. *Neuro Endocrinol Lett* 2009;30(1):91-8.

141. Eidukaite A, Tamosiunas V. Soluble HLA-G in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2008;89(2):465-7.
142. Olkowska-Truchanowicz J, Bocian K, Maksym RB, Bialoszewska A, Wlodarczyk D, Baranowski W, et al. CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2013;28(1):119-24.
143. Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, Tokushige N, Ganewatta S, Markham R, et al. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod* 2010;25(4):900-7.
144. Basta P, Majka M, Jozwicki W, Lukaszewska E, Knafel A, Grabiec M, et al. The frequency of CD25+CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in ectopic endometrium and ectopic decidua. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:116.
145. Budiu RA, Diaconu I, Chrissluis R, Dricu A, Edwards RP, Vlad AM. A conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis shows the presence of anti-MUC1 antibodies and Foxp3+ regulatory T cells. *Dis Model Mech* 2009 Nov;2(11-12):593-603.
146. Guzmán-Flores JM, Portales-Pérez DP. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Gac Med Mex* 2013;149(6):630-8.
147. Aller J. Endometriosis. *Fertilab* 2015:453-75.
148. Thomas EJ. Combining medical and surgical treatment for endometriosis: the best of both worlds? *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99 Suppl 7:5-8.
149. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84(2):300-4.
150. Bergqvist IA. Hormonal regulation of endometriosis and the rationales and effects of gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment: a review. *Hum Reprod* 1995;10(2):446-52.
151. Yisa SB, Okenwa AA, Husemeyer RP. Treatment of pelvic endometriosis with etonogestrel subdermal implant (Implanon). *J Fam Plann Reprod Health Care* 2005;31(1):67-70.
152. McGavigan CJ, Dockery P, Metaxa-Mariatou V, Campbell D, Stewart CJ, Cameron IT, et al. Hormonally mediated disturbance of angiogenesis in the human endometrium after exposure to intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 2003;18(1):77-84.
153. Glaspy JA. Therapeutic options in the management of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2002;29(3 Suppl 7):41-6.

154. Acien P, Quereda FJ, Gomez-Torres MJ, Bermejo R, Gutierrez M. GnRH analogues, transvaginal ultrasound-guided drainage and intracystic injection of recombinant interleukin-2 in the treatment of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2003;55(2):96-104.
155. Goss PE, Strasser K. Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(3):881-94.
156. Soysal S, Soysal ME, Ozer S, Gul N, Gezgin T. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2004;19(1):160-7.
157. Adamson GD, Pasta DJ. Surgical treatment of endometriosis-associated infertility: meta-analysis compared with survival analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(6):1488-504.
158. Tulandi T, Kabli N. Laparoscopy in patients with bleeding ectopic pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 2006;28(5):361-5.
159. Koike T, Minakami H, Motoyama M, Ogawa S, Fujiwara H, Sato I. Reproductive performance after ultrasound-guided transvaginal ethanol sclerotherapy for ovarian endometriotic cysts. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;105(1):39.
160. Hornung D, Fujii E, Lim KH, Vigne JL, McMaster MT, Taylor RN. Histocompatibility leukocyte antigen-G is not expressed by endometriosis or endometrial tissue. *Fertil Steril* 2001;75(4):814-7.
161. Wang Y, Ye Z, Meng XQ, Zheng SS. Expression of HLA-G in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011;10(2):158-63.
162. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167(3):1245-53.
163. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004;16(2):89-98.
164. Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008;7(5):370-5.
165. Lu L, Zhou X, Wang J, Zheng SG, Horwitz DA. Characterization of protective human CD4CD25 FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF-beta and retinoic acid. *PLoS One* 2010;5(12):e15150.
166. Okamoto A, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Regulatory T-cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:463412.
167. Mach P, Blecharz P, Basta P, Marianowski P, Skret-Magierlo J, Kojs Z, et al. Differences in the soluble HLA-G blood serum concentration levels in patients with ovarian cancer and ovarian and deep endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(5):387-95.

168. Meola J, Rosa e Silva JC, Dentillo DB, da Silva WAJ, Veiga-Castelli LC, Bernardes LA, et al. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2010;93(6):1750-73.
169. Morales PJ, Pace JL, Platt JS, Phillips TA, Morgan K, Fazleabas AT, et al. Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol* 2003;171(11):6215-24.
170. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006;12(3):209-32.
171. Desai N, Filipovits J, Goldfarb J. Secretion of soluble HLA-G by day 3 human embryos associated with higher pregnancy and implantation rates: assay of culture media using a new ELISA kit. *Reprod Biomed Online* 2006;13(2):272-7.
172. Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4+. *J Immunol* 2009;182(3):1689-95.
173. Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 2003;198(2):249-58.
174. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27.
175. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25(3):455-71.
176. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 2007;179(6):3578-87.
177. Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001;31(4):1122-31.
178. Omwandho CO, Konrad L, Halis G, Oehmke F, Tinneberg HR. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod* 2010;25(1):101-9.
179. Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LF, Baracat EC, Abrao MS. CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2012;68(4):301-8.
180. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008;26(1):212-22.

181. Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology* 2006;118(1):58-65.
182. Sarapik A, Haller-Kikkatalo K, Utt M, Teesalu K, Salumets A, Uibo R. Serum anti-endometrial antibodies in infertile women - potential risk factor for implantation failure. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(5):349-57.
183. Gajbhiye R, Suryawanshi A, Khan S, Meherji P, Warty N, Raut V, et al. Multiple endometrial antigens are targeted in autoimmune endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2008;16(6):817-24.
184. Moini A, Arabipoor A, Ashrafinia N. Risk factors for recurrence rate of ovarian endometriomas following a laparoscopic cystectomy. *Minerva Med* 2014;105(4):295-301.

