



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Determinación de polimorfismos del Antígeno Leucocitario Humano-G en endometriosis

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

Autor: Marina Llinares Esquerdo

Modalidad: Trabajo experimental

Tutor/es: Esther Caparrós Cayuela

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi tutora, Esther Caparrós, por todo el tiempo que ha dedicado a revisar al detalle cada apartado de mi trabajo para ayudarme a mejorarlo. Dar las gracias a M^a Francisca Colom, Profesora Titular del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología por cederme su laboratorio cada vez que lo he necesitado. Al Laboratorio Doctora María Domínguez del Instituto de Neurociencias por permitirme utilizar sus recursos y a la Doctora Irene Velasco sin la cual no habría muestras que analizar ni historias clínicas que cotejar. Finalmente, agradecer la ayuda de mis compañeros de laboratorio de los que tanto he aprendido durante estos meses: Mariavi, Paula, Miguel, Oriol y Carolina. Pero sobretodo, me gustaría dar las gracias a Laura Isabel Velásquez por la paciencia que ha tenido conmigo, explicándome una y otra vez los fundamentos de las técnicas que he utilizado, ayudándome a perfeccionar mis habilidades e interpretar datos y en especial, gracias por estar disponible para resolver mis dudas en cualquier momento, sin importar que fuese lunes, sábado o festivo.

GRACIAS.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) Y ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO-G (HLA-G).....	2
2.2 FUNCIONES DE HLA-G.....	5
2.3 HLA-G ESTRUCTURAS HOMOMULTIMÉRICAS.....	7
2.4 PAPEL DE HLA-G EN DISTINTAS PATOLOGÍAS.....	9
2.5 ENDOMETRIOSIS Y HLA-G.....	10
3.OBJETIVO.....	0
4.MATERIAL Y MÉTODOS.....	1
4.1 DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LAS PACIENTES.....	1
4.2 EXTRACCIÓN DE DNA.....	6
4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	7
4.4 ELECTROFORESIS.....	9
5.RESULTADOS.....	11
5.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE DNA.....	11
5.2 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS.....	12
5.3 CORRELACIÓN POLIMORFISMOS Y CUADRO CLÍNICO.....	14
6. DISCUSIÓN.....	16
7. CONCLUSIONES.....	20
8. ANEXOS.....	21
ANEXO 1:.....	21

1. RESUMEN

El antígeno leucocitario humano- G (HLA-G) pertenece a la familia de proteínas MHC clase Ib, moléculas que actúan induciendo la tolerancia inmune. Se expresa de forma constitutiva en células epiteliales tímicas, córnea, islotes pancreáticos y sobre todo en el citotrofoblasto extraveloso. Además, se ha observado la inducción de la expresión del gen que la codifica en determinadas patologías mediadas por el sistema inmune, tales como cáncer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes, trasplantes o como respuesta a estímulos como citoquinas o estrés. Otra enfermedad en la que parece estar relacionado el HLA-G es en la endometriosis, por ello, se propuso como objetivo de este trabajo investigar el papel de dos polimorfismos en la enfermedad: Inserción/delección de 14pares de bases (pb) del exón 8 de HLA-G, y alelo nulo HLA-G*0105 Nulo. Para ello, se realizó el análisis de 83 muestras de pacientes controles y con endometriosis, procedentes de suero, líquido peritoneal, líquido endometrial y líquido de quiste mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis, y se correlacionaron los resultados con información de las historias clínicas. Finalmente, las muestras que resultaron útiles para el estudio fueron 15, de las cuales: 2 presentaron el polimorfismo de Inserción/delección de 14pb del exón 8 de HLA-G, y 2 el alelo nulo HLA-G*0105N. Tras analizar los datos obtenidos junto con las historias clínicas no se pudo demostrar la existencia de una relación entre estos dos polimorfismos y la severidad de la sintomatología de pacientes con endometriosis.

2. ANTECEDENTES

2.1 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) Y ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO-G (HLA-G)

El MHC (Major Histocompatibility Complex), también conocido como HLA (Human Leukocyte Antigen) en humanos, es una molécula que fue descubierta inicialmente por su implicación en el rechazo a trasplantes entre individuos de la misma especie, y cuya función es la presentación de péptidos a linfocitos T. Existen dos tipos de MHC: MHC-I y MHC-II. Las moléculas clase uno se expresan de forma constitutiva en casi todas las células nucleadas, presentan antígenos intracelulares, tumorales y víricos y son reconocidas por linfocitos T CD8+. Mientras que las moléculas clase II se expresan únicamente en células dendríticas, macrófagos y células B, presentan antígenos extracelulares y bacterianos y son reconocidas por linfocitos T CD4+. Dentro del MHC clase I también es posible distinguir dos subgrupos: MHC-A, MHC-B y MHC-C que son moléculas MHC-I clásica (MHC-Ia) y MHC-E, MHC-F, MHC-G y MHC-H que se clasifican como moléculas MHC-I no clásicas (MHC-Ib). De la misma forma, el MHC clase II también se divide en moléculas MHC-II clásicas (MHC-IIa): MHC-DP, MHC-DQ y MHC-DR; y moléculas MHC-II no clásicas (MHC-IIb): MHC-DM y MHC-DO (1).

Los genes que codifican las moléculas MHC se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 (aproximadamente 3500 Kb). Estos genes son muy polimórficos y presentan una expresión codominante: cada persona expresa en la membrana de sus células las proteínas MHC codificadas por los alelos heredados de ambos progenitores.

El antígeno leucocitario humano- G (HLA-G), que pertenece a la familia de proteínas MHC clase Ib, fue descubierto por primera vez en células del

¹ Parham P. The immune system. 2nd ed. Giovanniello O, Ed. Medica Panamericana;2005. 25-8.

trofoblasto extraveloso en 1986⁽²⁾. Aunque forma parte del grupo de moléculas no clásicas, la estructura del HLA-G es similar a la de las moléculas HLA I clásicas (sobre todo a la de HLA-A); se trata de un heterodímero con una cadena pesada anclada a la membrana y una cadena β -2 microglobulina. Además, al igual que las moléculas HLA clase Ia, el gen que codifica el HLA-G también se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6. Sin embargo, existen desigualdades en relación a su patrón de expresión, su función y grado de polimorfismo.

En referencia a la expresión, a diferencia de las moléculas HLA-Ia que están presentes en todas las células nucleadas del organismo, el HLA-G se expresa de forma constitutiva únicamente en células epiteliales tímicas, córnea, islotes pancreáticos y sobre todo en el citotrofoblasto extraveloso que invade el tejido decidual, en el trofoblasto intersticial, en las células endoteliales de los vasos fetales y en las arterias espirales maternas ⁽³⁾. Además, se ha observado la inducción de la expresión de este gen en determinadas patologías mediadas por el sistema inmune, tales como cáncer ^(4,5,6), infecciones virales ⁽⁷⁾,

² Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology*. 1986;59:595-601.

³ Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. *Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo*. *Ginecol Obstet*. 2012; 80 (5)332-40.

⁴ Yie SM, Yang H, Vosotros SR, Li K, Dong DD, Lin XM. Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) correlates with poor prognosis in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14 (10): 2721-9.

⁵ Shang-rong Y, Hong Y, Ke L, Dan-dan D, Xin-mei L, Shang-mian Y. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Modern Pathology*. 2007; 20: 375–83.

⁶ Loumagne L, Baudhuin J, Favier B, Montespan F, Carosella ED, Rouas-Freiss N. In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance. *Int J Cancer*. 2014;135(9):2107-17.

⁷ Amiot L, Vu N, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Chalmel F, Gascan H, et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *J Hepatol*. 2014;60(2):245-52.

enfermedades autoinmunes, trasplantes⁽⁸⁾ o como respuesta a estímulos como citoquinas (IL-10) o estrés⁽⁹⁾.

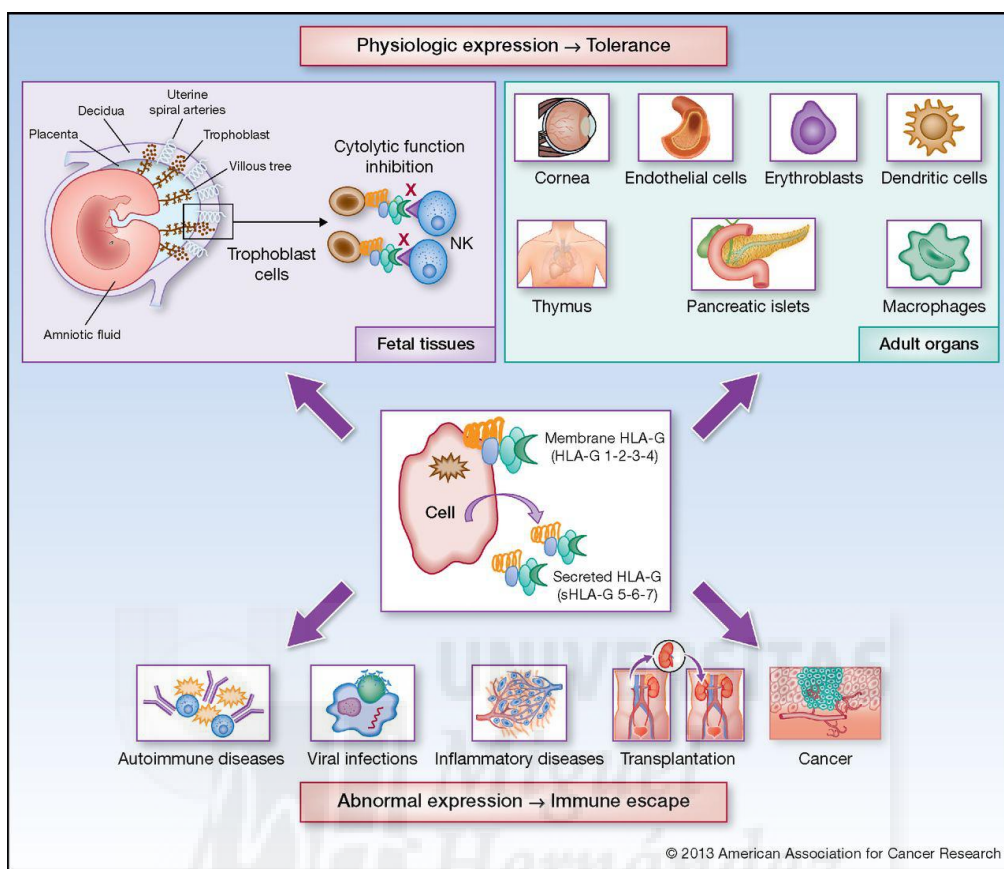


Figura 1: Patrón de expresión de la molécula HLA-G en el organismo.

Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res.* 2013;19(20):5564-71

En cuanto al polimorfismo genético, el HLA-G presenta un grado de variación muy bajo (31 alelos) frente a los genes clásicos de los cuales se conocen gran cantidad de alelos (HLA-A=767 alelos, HLA-B=1178 alelos, HLA-C=439 alelos).

⁸ Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN, et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation.* 2002;105:1949-54.

⁹ Ibrahim ED, Morange M, Dausset J, Carosella ED, Paul P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. *Cell Stress Chaperones.* 2000; 5: 207-18.

Por último, mientras que la función de las proteínas HLA I clásicas es la presentación de péptidos a células T CD8+ para activar la respuesta inmune, las moléculas HLA-G actúan induciendo la tolerancia inmune tras ser reconocidos por ILT2/CD85j/LILRB1 (ILT2), ILT4/CD85d/LILRB2 (ILT4) o KIR2DL4/CD158d (KIR2DL4)⁽¹⁰⁾. El receptor ILT2 es expresado en la superficie de células B, en monocitos y macrófagos, células dendríticas mieloides e incluso en algunas células T y NK. Sin embargo, ILT4 solo se expresa por monocitos, macrófagos y células dendríticas, y KIR2DL4 únicamente por células NK CD56. Otra característica de los receptores que reconocen HLA-G es que ILT2 e ILT4 reaccionan también con HLA clase I clásicas, mientras que KIR2DL4 sólo reconoce moléculas HLA-Ib. A pesar de ello, la interacción ILT2 o ILT4 /HLA-G es más fuerte. Por último, estos receptores difieren en la función que realizan. Por un lado, ILT2 y ILT4 son receptores inhibidores mientras que KIR2DL4 puede actuar como receptor inhibidor y como activador ⁽¹¹⁾.

2.2 FUNCIONES DE HLA-G

Estructuralmente, el HLA-G tiene siete isoformas resultado del empalme alternativo de un mismo RNA precursor: cuatro unidas a la membrana (HLA-G1, G2, G3 y G4) y tres solubles (HLA-G5, G6 y G7) ⁽¹²⁾. Todas las isoformas, solubles o ancladas a la membrana, tienen en común el dominio $\alpha 1$ de la región

¹⁰ LeMaout J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. FASEB J.2005; 19: 662-4.

¹¹ Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaout J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. Blood. 2008;111(10):4862-70.

¹² O'Callaghan CA, Bell JI. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. Immunol Rev.1998; 163: 129-38.

extracelular, lo que les permite mediar la protección de las células T y NK a citotoxicidad. Concretamente las isoformas solubles, al ser reconocidas por los receptores de las células NK y de células CD8+ activadas, inducen la apoptosis de las células inmunológicas (13), y además, el sHLA-G modula las respuestas aloцитотóxicas de células T CD4+ y CD8+, y NK haciéndolos incapaces de reaccionar ante la estimulación antigénica (14,15). Por otro lado, el HLA -G unido a membrana inhibe la citólisis mediada por células T y NK (16), e induce la producción de citocinas Th2 (17). Por último, durante el contacto célula-célula, moléculas HLA-G unidas a la membrana de células tumorales y células presentadoras de antígenos(APC) se pueden adquirir por NK activadas, APC y células T dando lugar a una inversión funcional inmediata. Las células a las que se transfieren moléculas de HLA-G a través de un proceso conocido como trogocitosis (18) pasan de actuar como células efectoras a comportarse como

13 Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol.* 2000; 164: 6100-4.

14 Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, Choppin J, Dausset J, Carosella ED, et al. A soluble HLA -G protein that inhibits natural killer cell -mediated cytotoxicity. *Transplant Proc.* 2001; 33: 2355-9.

15 Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N, Librach CL. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology.* 2000; 101: 191-200.

16 Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol.* 2001; 166: 5018-26.

17 Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Hyodo H, Miki A, et al. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol.* 2001; 45: 94-9.

18 Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol.* 2003;4:815.

células T reguladoras (T reg). Con este mecanismo se consigue una supresión de la respuesta inmune que da lugar a un efecto tolerogénico a largo plazo.

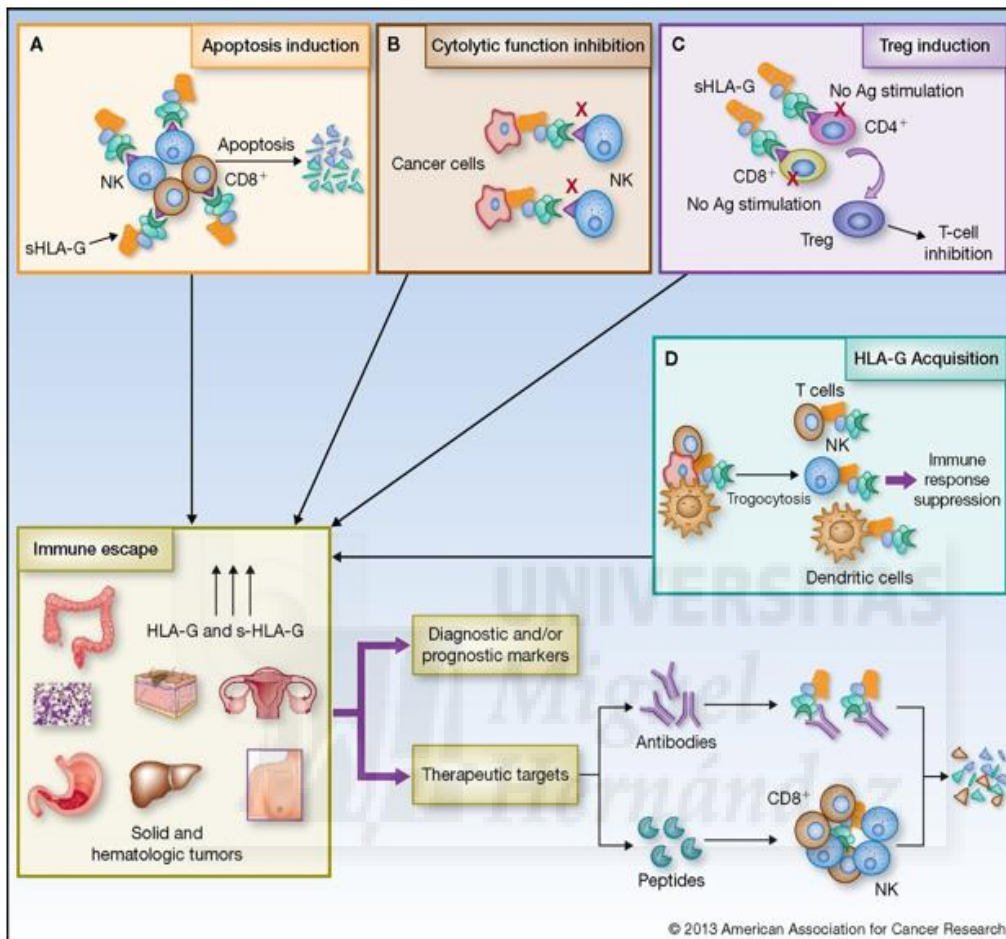


Figura 2: Mecanismos de escape inmunológico, basados en el Antígeno Leucocitario Humano G, utilizados por células tumorales.

Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res.* 2013;19(20):5564-71.

2.3 HLA-G ESTRUCTURAS HOMOMULTIMÉRICAS⁽¹⁹⁾

El HLA-G posee en su cadena pesada dos residuos de cisteína únicos en las posiciones 42 (Cys42) y 147 (Cys147) que pueden interactuar con los residuos

¹⁹Gonen-Gross T, Achdout H, Gazit R, Hanna J, Mizrahi S, Markel G. Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. *J Immunol.* 2003;171:1343-51.

de cisteína de otra molécula de HLA-G formando puentes disulfuro entre ellas. La creación de estos enlaces da lugar a homodímeros (Cys42-Cys42), los cuales, aunque mantienen la misma estructura principal, presentan una orientación diferente de su estructura 3D de forma que los sitios de unión a los receptores IL2 y IL4 son más accesibles que los de los monómeros. Como consecuencia, los receptores de los dímeros de HLA-G se unen con mayor afinidad a estos receptores. Por ello, se cree que la función inhibidora del HLA-G es principalmente consecuencia de la acción de dímeros y no de monómeros. La creación de puentes disulfuro se puede producir también entre los residuos Cys42-Cys147 de tres moléculas distintas, dando lugar a homotrímeros. En la actualidad estas estructuras triméricas sólo parecen ser posibles entre moléculas HLA-G1 y/o HLA-G5, ya que el resto de isoformas parecen no poseer el residuo de cisteína en la posición 147 del dominio $\alpha 2$.

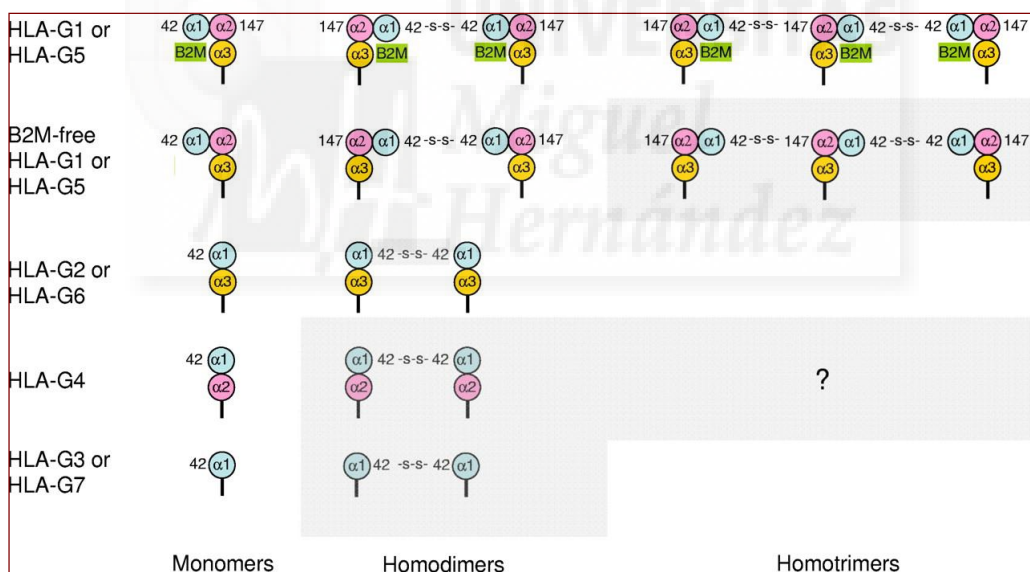


Figura 3: Estructuras homomultiméricas del HLA-G

Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*. 2008;111(10):4862-70.

2.4 PAPEL DE HLA-G EN DISTINTAS PATOLOGÍAS

El papel del antígeno HLA-G como molécula inductora de tolerancia inmune ha hecho que se investigue su implicación en diversas patologías, dado que este conocimiento puede resultar muy útil con el fin de utilizar en un futuro la detección molecular de HLA-G como estrategia terapéutica en unos casos, o como marcador de pronóstico de la enfermedad en otros. En primer lugar, se ha demostrado la presencia de estas moléculas en la superficie de células tumorales (4). Esto puede interpretarse como un mecanismo utilizado por las células malignas para evadir la acción de vigilancia del sistema inmune. Del mismo modo que los tumores, las infecciones víricas (7), tales como el Virus de la Hepatitis C también podrían utilizar la expresión moléculas HLA-G como mecanismo de defensa. En estos dos casos, la detección de HLA-G podría utilizarse como marcador de pronóstico negativo de la enfermedad. Por otro lado, hay estudios que demuestran la relación entre sHLA-G e IgE en pacientes alérgicos y refuerzan el concepto de que sHLA-G podría ser un biomarcador de la reacción alérgica (20). Por último, hay dos casos en los que la presencia de HLA-G puede ser utilizada como marcador de pronóstico positivo: trasplantes y embarazo. Se ha demostrado que los injertos con mayor expresión de HLA-G tienen una menor probabilidad de rechazo (8). Este aumento de la tolerancia del huésped podría deberse a una mayor capacidad de algunos aloinjertos de evadir el reconocimiento y ataque de linfocitos T CD8+ y células NK, capacidad adquirida por la presencia de HLA-G.

Un caso más complejo es el embarazo. Durante la gestación son muchos los factores que actúan interrelacionados entre ellos dando lugar a la tolerancia materno-fetal. Una variación de su equilibrio intrauterino puede desencadenar

²⁰ Ciprandi G, DeAmici M. Soluble HLA-G serum levels depend on allergy type and IgE levels. *Allergy Rhinol* (Providence). 2014;5(1):9-11.

patologías como preeclampsia, infertilidad o abortos recurrentes (²¹). Dado que el feto se considera un trasplante semialogénico (²²), algunos de los mecanismos que determinan el pronóstico del embarazo tienen características comunes a las de los trasplantes. De la misma forma que en los trasplantes el HLA-G favorece la implantación, en el embarazo también favorece la tolerancia de la madre al feto, es por ello que en la placenta se produce una sustitución de proteínas HLA clásicas por proteínas HLA no clásicas: HLA-C, HLA-E y HLA-G.

2.5 ENDOMETRIOSIS Y HLA-G

Según el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, la endometriosis afecta a un 10% de las mujeres en edad fértil y hasta un 50% de las mujeres infértiles. El MSSSI define la enfermedad como la implantación y crecimiento benigno de tejido endometrial (glándulas y estroma) en lugares ectópicos, siendo las localizaciones más frecuentemente afectadas el peritoneo pélvico y los ovarios, aunque también pueden encontrarse lesiones en otras zonas como el intestino, pulmones, etc. Este tejido tiene dependencia hormonal del ciclo menstrual, produciéndose sangrado y desprendimiento del mismo con la menstruación. Se trata de una enfermedad crónica de la que no se conocen con exactitud las causas aunque existen distintas teorías que intentan explicar la etiología de la endometriosis. En la actualidad existen cuatro teorías para explicar la patogénesis de la endometriosis: metaplasia celómica, restos de células embrionarias, diseminación linfática y vascular y trasplante de tejido endometrial. De estas hipótesis, una de las más aceptadas es la propuesta por

²¹ Somigliana E, Viganò P, Vignali M. Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? Human reproduction update. 1999;5: 40-51 .

²² Ober C. HLA and Pregnancy: The paradox of the fetal allograft. Am J Hum Genet. 1998;62(1):1-5.

Sampson en 1927 o teoría de la menstruación retrógrada ^(23,24). La menstruación retrógrada es un fenómeno frecuente y se presenta entre el 76% y el 90% de las mujeres con trompas de Falopio permeables ^(25,26). Sampson sugirió que durante la menstruación retrógrada, células endometriales podrían ascender a la cavidad abdominal a través de las trompas de Falopio, dónde se implantan como un injerto de tejido. Diferentes ensayos han estudiado la posibilidad de que sea una disminución de la actividad citotóxica de las células NK la que permita la supervivencia de células endometriales en lugares ectópicos y su posterior implantación ⁽²⁷⁾. Según estos estudios la disminución de actividad de las células NK se debe a diferencias funcionales en las células NK de pacientes con endometriosis con respecto a las de las mujeres sanas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de estas células ^(28,29). Aunque no se conocen con claridad los motivos de la menor actividad citotóxica de células NK, esta parece deberse a una expresión mayor de antígenos que son reconocidos por receptores inhibitorios de las NK, en mujeres con

²³ Sampson J. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue to the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14- 422.

²⁴ Sampson J. Perforating haemorrhagic cysts of the ovary. *Arch Surg.*1927;3:245-323.

²⁵ Senturk LM, Arici A. Immunology of endometriosis. *J Reprod Immunol.*1999; 43(1): 67-83.

²⁶ Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.*1984; 64: 151-4.

²⁷ Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninck PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril.* 1991;56:45-51.

²⁸ 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;31:25-31.

²⁹ Oosterlynck k 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;58:290-5.

endometriosis frente a mujeres sanas ⁽³⁰⁾. Del mismo modo, la expresión de HLA-G en células endometriales ectópicas también parecen favorecer el desarrollo de la enfermedad ^(31,32) ya que se ha identificado la expresión de HLA-G en epitelio glandular de implantes de endometriosis peritoneal, pero no en el endometrio eutópico. Cabe destacar que también hay variaciones en cuanto a la expresión de HLA-G en las propias pacientes en función de la fase menstrual en la que se encuentren. Se ha visto que el antígeno se detecta en el líquido peritoneal de las pacientes solamente durante la fase menstrual y no es detectable durante la fase proliferativa y la de secreción. Por ello, se llegó a la conclusión de que la expresión diferencial de HLA-G sugiere que la inflamación peritoneal o estrés celular pueden regular los mecanismos para promover la supervivencia de las células del endometrio ectópico ⁽³⁰⁾.



³⁰ Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Oguri H, Kusume T, Fukaya T. Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril.* 2002; 77: 297-302.

³¹ Maeda N, Izumiya C, Taniguchi K, Matsushima S, Fukaya T. Role of NK cells and HLA-G in endometriosis. *Front Biosci.*2012;4:1568-81.

³² Barrier BF, Kendal BSI, Ryan CE, Sharpe-Timms KL. HLA-G is expressed by the glandular epithelium of peritoneal endometriosis but not in eutopic endometrium. *Hum Reprod.*2006; 21:864-9.

3.OBJETIVO

Los polimorfismos del gen HLA-G se han relacionado con diferencias en el perfil de expresión génica dando lugar a la transcripción de empalmes alternativos del mRNA de HLA-G o variaciones en la estabilidad del mRNA (³³). Las alteraciones del mRNA provocadas por polimorfismos pueden manifestarse con variaciones en la cantidad, estabilidad o en la función del antígeno. Puesto que el HLA-G tiene una gran influencia en algunas patologías, es interesante conocer el papel de los polimorfismos en la aparición y el desarrollo de estas enfermedades.

En nuestro estudio, se pretende investigar el **papel de dos polimorfismos del gen HLA-G en la evolución de pacientes con endometriosis** y correlación entre la presencia de alteraciones en la expresión del gen que codifica el HLA-G con la gravedad del cuadro sintomático de estas pacientes.

Para ello, se va a realizar la determinación de dos polimorfismos génicos, en muestras de suero, plasma o líquido peritoneal de mujeres con endometriosis y donantes control. Estos polimorfismos son:

- Inserción/delección de 14pares de bases(pb) del exón 8 de HLA-G, y
- Alelo nulo HLA-G*0105N=delección de una citosina en la primera base del codón 130 o en la tercera del codón 129 (mutación 1597 del C); la presencia de los cuales dará lugar a la transcripción de mRNA inestable.

³³ Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. HLA-G and IL-10 in plasma in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2004, 56(3), 135-41.

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LAS PACIENTES

Muestras

Evaluamos 83 muestras de pacientes diagnosticadas con patología ovárica y donantes control provenientes del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario de San Juan (Alicante), de las cuales:

Suero n= 46

Líquido Peritoneal n= 31

Líquido Endometrial n= 4

Líquido Quiste n=2

Tanto el líquido endometrial como el peritoneal y quiste se obtuvieron mediante procedimientos quirúrgicos; posteriormente, las muestras fueron tomadas, enviadas y congeladas a -20°C hasta su análisis.

Para el estudio de nuestras muestras establecimos ciertos parámetros para la validez del posterior análisis de resultados:

- Ausencia de degradación o cantidad mínima de DNA..
- Amplificación de Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Control Positivo Interno PCR).
- Acceso a Historia Clínica.

Finalmente, de las 83 muestras estudiadas inicialmente, nos quedamos con el resultado de 15 debido a que el resto no cumplían con los parámetros que nos habíamos establecido para la realización del estudio.

Las muestras fueron las siguientes:

Suero n= 10

Líquido Peritoneal n= 5

Líquido Endometrial n= 0

Líquido Quiste n= 0

Variables Clínicas

Las variables clínicas descritas se recogen en la Tabla 3.

VARIABLES CLÍNICAS	
Nº	Número de muestra
ENDOM	Diagnóstico de endometriosis: Sí/No
EDAD	Años
ESTERIL	Presentan esterilidad en el momento de inclusión en el estudio. Sí/No
DISM0	Dismenorrea a tiempo 0 (Dolor con las menstruaciones en el momento de inclusión en el estudio).
DISP0	Dispareunia a tiempo 0 (Dolor con las relaciones sexuales en el momento de inclusión en el estudio).
ALGPELO	Algia pélvica a tiempo 0 (Dolor abdominal en el momento de inclusión en el estudio).
OTROS	Sí/No (otros síntomas secundarios frecuentes como cefaleas, dolores ovulatorios, mareos, etc)
EAV0	Valor de la Escala Analógico-visual a tiempo 0, entre 0-10. En esta escala se recogen los tres síntomas principales asociados a la endometriosis (dismenorrea, dispareunia y algia pélvica) y los secundarios, de forma que las pacientes valoran el grado de dolor que sufren. Los síntomas principales los valoran de 0 a 3 e indican presencia de otros síntomas (se valora con 1 punto). La suma de los 4 factores dan los valores de la escala (Ej. 3+3+3+1=10). A considerar EAV >4.

CA1250	Valor de CA125 (U/ml) a tiempo 0. Se ha demostrado que los niveles de esta glicoproteína se incrementan tanto en pacientes con cáncer epitelial de ovario (EOC) como en pacientes con enfermedades ováricas benignas como la endometriosis ⁽³⁴⁾ . Se considera elevado > 35 U/ml.
CATENDOM	Grado de severidad de la endometriosis. NO ENDOMETRIOSIS/ LEVE/ MODERADA/ SEVERA
CLINICAÑO	Clínica general que presentan las pacientes al año de la intervención. Los parámetros a tener en cuenta son los síntomas (EAV), tamaño del endometrioma y valor de CA125. Se considera <u>recurrencia de algún parámetro</u> si: EAV >4, tamaño del endometrioma >3cm o CA125 >35U/ml. Se considera <u>paciente recurrente</u> si se reactivan como mínimo 2 parámetros.

Tabla 1: Tabla resumen de las variables clínicas usadas para caracterizar a las mujeres con patología ovárica

Por último, las características clínicas conseguidas de las pacientes de las que se disponía de muestras en la seroteca del laboratorio, se ordenaron en la tabla 4.

³⁴ Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: the past and the future. Int J Biol Markers. 1998;13:179–87.

Nº	ENDOM	EDAD	ESTERIL	DISMENO	DISPO	ALPELO	OTROSO	EAV0	CA1250	CATENDO
1	SÍ	22	NO	moderada	no dispareunia	moderada	SI	5	60	MODERADA
2	NO	28	NO	leve	moderada	moderada	NO	4	12,61	NO
3	SÍ	29	NO	severa	severa	moderada	SI	8	339,6	SEVERA
4	NO	32	NO	moderada	no dispareunia	leve	NO	3	15,71	NO
5	SÍ	25	NO	moderada	leve	moderada	SI	5	63,6	SEVERA
6	SÍ	25	NO	moderada	leve	moderada	SI	5	63,6	SEVERA
7	SÍ	35	SÍ	leve	no dispareunia	no algia	NO	1	.	LEVE
8	SÍ	49	NO	no	leve	severa	NO	4	28	SEVERA
9	SI	42	NO	leve	no dispareunia	no algia	NO	1	235	SEVERA
10	SÍ	36	NO	moderada	no dispareunia	moderada	SI	2	.	SEVERA
11	NO	26	NO	leve	moderada	moderada	SI	6	16,9	NO
12	NO	35	SI	leve	no dispareunia	no algia	-	1	4.76	NO
13	SÍ	27	NO	moderada	moderada	leve	SI	6	156	SEVERA
14	SÍ	39	NO	severa	leve	no algia	SI	4	800,13	SEVERA
15	SÍ	36	NO	moderada	leve	moderada	SI	6	21,9	MODERADA

Tabla 2: Cuadro que resume las características clínicas de las mujeres con patología ovárica incluidas en el estudio

4.2 EXTRACCIÓN DE DNA ⁽³⁵⁾

Para el aislamiento y la purificación del DNA genómico tomamos 200 µl de la muestra. Utilizamos un kit comercial: QIAamp DSP DNA Blood Mini, el cual utiliza la tecnología de columna de gel de sílice (tecnología QIAamp).

El procedimiento de extracción del kit comprende 4 etapas:

1. Lisis de las células presentes en la muestra
2. Adhesión a la membrana de una columna de centrifugación del DNA del lisado
3. Lavado de la membrana
4. Elución del DNA genómico de la membrana

1. Lisis de las células presentes en la muestra

La lisis se consigue sometiendo a las muestras a condiciones de desnaturalización: altas temperaturas, presencia de proteasa QIAGEN y solución tampón de lisis.

2. Adhesión a la membrana de una columna de centrifugación del DNA del lisado

Para optimizar la unión del DNA genómico a la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini se añade en primer lugar etanol a los lisados eliminando así la capa hidratante del DNA y exponiendo sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente.

Cada lisado se trasvasa en una columna de centrifugación QIAamp Mini y las columnas se someten a centrifugación a 1300 rpm. Debido a la fuerza centrífuga, el lisado atraviesa la membrana de la columna y el DNA genómico queda adherido a la membrana de gel de sílice.

³⁵ Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. [2012, 2015] Disponible en: <https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=ae7d88bf-08db-40fd-abd5-3e173227d2d2&lang=en>

3. Lavado del DNA de residuos

Por la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini los contaminantes se eliminan de manera eficaz primero con la solución tampón de lavado 1 (AW1) y seguidamente con la solución tampón de lavado 2 (AW2).

4. Elución de DNA genómico puro

El ADN genómico se eluye de la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini con 50–200 µl de solución tampón de elución (AE) que lo hidrata facilitando su liberación. El DNA eluido está listo para su uso en distintos ensayos subsiguientes, incluidos diversos tipos de ensayos de diagnóstico in vitro.

Una vez extraído el DNA de las muestras, se cuantificó y se midió su pureza utilizando el sistema Nanodrop (Thermo Scientific).

4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En segundo lugar, para facilitar el estudio del DNA obtenido de las muestras, se realizó una técnica de amplificación conocida como PCR. Este proceso consiste en sintetizar muchas veces un fragmento de DNA utilizando una polimerasa termoestable que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*: *Taq* polimerasa.

Para llevar a cabo la amplificación de cada una de las muestras se prepararon 90 µl de una mezcla de reacción cuya composición se muestra en la Tabla 1.

Mezcla de reacción para PCR	
Buffer PCR	10 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs	2 µl

Taq polimerasa (Qiagen)	2 µl
Primers (Qiagen)	
-Forward	2 µl
-Reverse	2µl
Muestra de DNA (1 µg)	60 µl
Agua desionizada	10 µl

Tabla 3. Composición de mezcla de reacción para la PCR

En cuanto a los primers utilizados para el estudio del DNA fueron seis, los cuales se detallan en la tabla 2.

Región amplificada	Secuencia 5'-3' (Primers)
GAPDH enzo	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G – Forward
	TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT - Reverse
Polimorfismo de inserción/delección de 14pb en el exón 8 (3'-UTR) del gen HLA-G	ATG GTG GGC TGT TTA TGT AAG CAC C- Forward
	GGA AGG AAT GCA GTT CAG CAT GA- Reverse
Polimorfismo de delección de una citosina en el codón 130 (mutación 1597 del C) - Alelo nulo HLA-G*01:05N	CAC CCT CCA GTG GAT GAT TG - Forward
	CAG CAT CTC CTT CCC GTT CT - Reverse

Tabla 4. Primers de utilidad en polimorfismos del gen HLA-G

Una vez obtenida la mezcla, las muestras se sometieron a altas temperaturas para que el enzima Taq polimerasa realizara la reacción de amplificación. Se utilizó un sistema automatizado de PCR (termociclador Mastercycler, Eppendorf) en el que se realizaron los siguientes ciclos: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 s, hibridación a 60°C durante 30 s y extensión final a 72°C, con una fase adicional de extensión a 72°C durante 5 min. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento y visualización.

4.4 ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica basada en la migración de macromoléculas iónicas provocada por el efecto de un campo eléctrico en función de su carga, peso molecular y estructura; las partículas de DNA (con grupos fosfato cargados negativamente) al ser sometidos a una corriente eléctrica que atraviesa el gel, migran atravesando la agarosa hacia el ánodo ⁽³⁶⁾. Por este método podemos visualizar los productos amplificados.

Preparación del gel de agarosa (1%).

Se añade 1 g de agarosa en una solución compuesta por 90 mL de agua y 10ml de Tris Acetato EDTA (TAE). A continuación la mezcla se calienta y, tras llegar a ebullición, se le adicionan 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) y se deja enfriar en el molde.

Preparación de la muestra y carga de la muestra

Se mezclan 10 µL de la solución de DNA con 2 µL del tampón de carga. Para cargar las muestras se pipetea 10-12 µL de la solución anterior en los pocillos correspondientes. Este proceso se repite con cada una de las muestras. Como control de peso molecular se empleó un marcador estándar (SIGMA).

³⁶ Somma M, Querci M. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos; Electroforesis en gel de agarosa. OMS. Disponible en:
<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n5.pdf>

La electroforesis se lleva a cabo durante 30 minutos aproximadamente a 200 V. Finalmente, el gel se visualiza en un transiluminador de UV (Bio-Rad's Gel Doc XR+ system). Las bandas de DNA poseen brillo característico, el cual permite estimar su tamaño en función de la posición alcanzada tras la migración con respecto a la posición de las bandas del marcador molecular.



5.RESULTADOS

5.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE DNA

Las concentraciones de DNA presentes en las muestras tras la extracción se determinaron con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Las muestras analizadas fueron las 83 iniciales (Anexo 1), sin embargo, en la Tabla 3 se recoge la información de las 15 muestras con las que nos quedamos al final del trabajo para estudiar sus resultados.

Numero	Tipo de Muestra	R 260/280 (nm)	Concentración (µg/µl)
1	Suero	1.43	5.7
2	Suero	2.13	5.6
3	Suero	1.60	4.1
4	Suero	2.00	6.9
5	Líquido Peritoneal	1.17	10.6
6	Suero	1.51	3.5
7	Suero	1.24	5.6
8	Suero	1.52	4.2
9	Líquido Peritoneal	2.07	6.1
10	Suero	1.14	2.6
11	Suero	1.41	8.5
12	Líquido Peritoneal	1.38	5.4
13	Líquido Peritoneal	1.77	5.0
14	Líquido Peritoneal	1.26	7.2
15	Suero	1.47	10.7

Tabla 5: Resultado de la cuantificación de las muestras de DNA

5.2 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN MUESTRAS DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS Y CONTROLES.

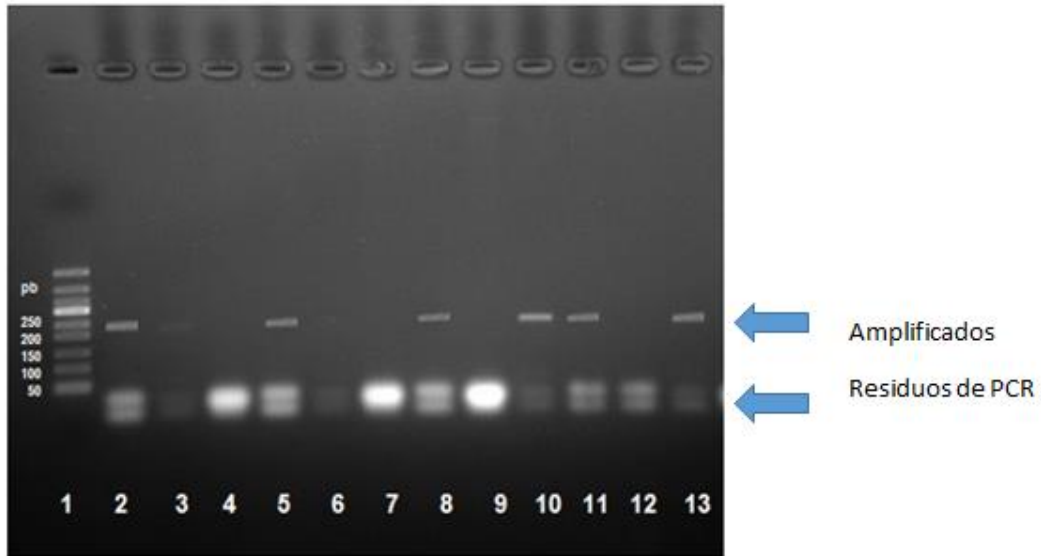
Los polimorfismos estudiados fueron:

- Inserción/delección de 14 pb del exón 8 de HLA-G.
- Alelo nulo HLA-G*0105N: delección de una citosina en el codón 130 (mutación 1597 del C).

Como normalizador se utilizó la determinación del gen que codifica el enzima GAPDH (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa). Este gen se expresa en toda las células del organismo ya que codifica una proteína que es esencial para su supervivencia: la GAPDH, un enzima multifuncional imprescindible para llevar a cabo la glucólisis. Al ser un gen de bajo número de copias tiene una baja frecuencia de isoformas o pseudogenes lo que disminuye la posibilidad de reacción cruzada.

Como se muestra en la Figura 4, los productos de la amplificación fueron bandas con una longitud comprendida entre 200 y 250 pares de bases:

- GAPDH ⇒ 240pb
- HLA-G inserción / delección del 14bp en el exón 8 ⇒ 226pb
- HLA-G*01:05N ⇒ 223pb



PCR 16-03-2015 (2)

Carril 1: Marcador

Carril 2: Muestra 1 GAPDH +

Carril 3: Muestra 1 HLAG +

Carril 4: Muestra 1 0105N -

Carril 5: Muestra 2 GAPDH +

Carril 6: Muestra 2 HLAG -

Carril 7: Muestra 2 0105N -

Carril 8: Muestra 3 GAPDH +

Carril 9: Muestra 3 HLAG -

Carril 10: Muestra 3 0105N +

Carril 11: Muestra 4 GAPDH +

Carril 12: Muestra 4 HLAG -

Carril 13: Muestra 4 0105N +

Figura 4: Ejemplo de la visualización de la electroforesis de cuatro muestras en las que se ha realizado la amplificación de GAPDH, HLA-G inserción/delección de 14pb del exón 8 y HLA-G *01:05N.

Las electroforesis en las que el GAPDH (normalizador) no fue positivo (Figura 5) no se tuvieron en cuenta en los resultados.

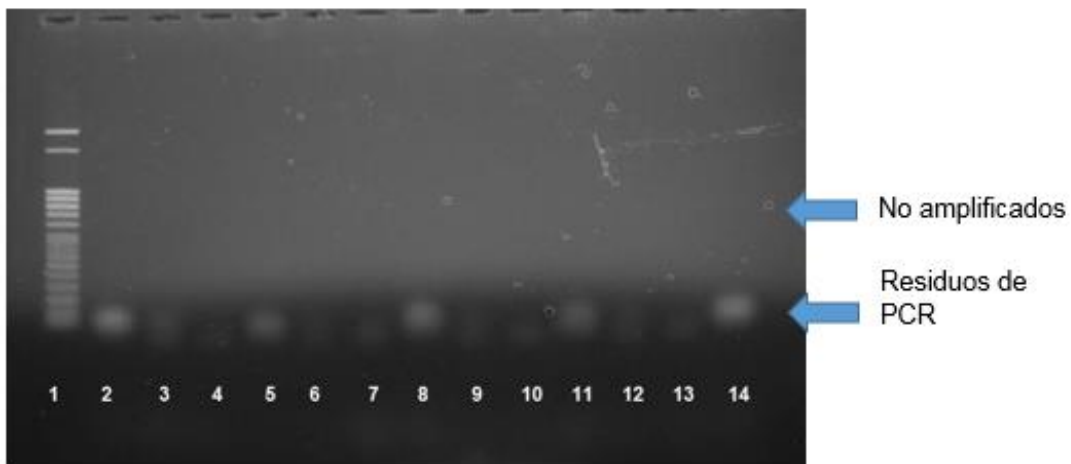


Figura 5: Ejemplo de electroforesis de muestras en las que se ha realizado la amplificación de GAPDH, HLA-G inserción/delección de 14pb y HLA-G *01:05N sin amplificados visibles.

5.3 CORRELACIÓN POLIMORFISMOS Y CUADRO CLÍNICO.

Nº	Tipo de Muestra	Categoría Endometriosis	GAPDH	HLA-G del/inser 14 pb	HLA-G 01:05 N
1	Suero	Moderada	X	X	
2	Suero	No Endometriosis Control	X		X
3	Suero	Severa	X		
4	Suero	No Endometriosis Control	X	X	
5	Líquido Peritoneal	Severa	X		
6	Suero	Severa	X		
7	Suero	Leve	X		
8	Suero	Severa	X		
9	Líquido Peritoneal	Severa	X		
10	Suero	Severa	X	X	
11	Suero	No Endometriosis Control	X		
12	Líquido Peritoneal	No Endometriosis Control	X		

13	Líquido Peritoneal	Severa	X		X
14	Líquido Peritoneal	Severa	X	X	
15	Suero	Severa	X		

Tabla 6. Correlación polimorfismos HLA-G con severidad clínica de endometriosis.



6. DISCUSIÓN

La molécula HLA-G ha demostrado actuar como un factor inductor de tolerancia en procesos fisiológicos y, además, se ha comprobado su implicación en numerosas patologías. Es por esto, que los estudios de la proteína HLA-G y el gen que la codifica han aumentado considerablemente en los últimos años intentando esclarecer el mecanismo por el cual lleva a cabo sus funciones. Sin embargo, todavía su papel funcional no está completamente definido.

Los polimorfismos del gen HLA-G parecen estar asociados a ciertas patologías al dificultar la tolerancia inmune por variaciones en la cantidad, estabilidad o en la función la molécula. Esto ocurre porque las alteraciones del gen dan lugar a una transcripción de empalmes alternativos del mRNA de HLA-G o variaciones en la estabilidad del mRNA ⁽³⁷⁾ de los cuales se obtienen proteínas truncadas o cantidades deficitarias de las mismas.

Por todo ello, el objetivo que se planteó fue estudiar la incidencia de polimorfismos de HLA-G en una patología en concreto y analizar la correlación con la evolución de la enfermedad. Dada la influencia que presenta el HLA-G en la gestación, y la existencia de fluctuaciones de los niveles de la proteína en el útero en condiciones patológicas, se decidió investigar el papel de dos polimorfismos del gen HLA-G en la evolución y desarrollo de la endometriosis.

Aunque la etiopatogénesis de la endometriosis no se conoce con claridad, la hipótesis más destacada actualmente es la propuesta por Sampson, teoría de la menstruación retrógrada ⁽²⁴⁾, según la cual, células del endometrio atraviesan las trompas de Falopio durante la menstruación. Estas células parecen sobrevivir e implantarse debido una inhibición de la actividad citotóxica de las

³⁷ Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. HLA-G and IL-10 in plasma in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2004, 56(3), 135-41.

células NK en la cavidad peritoneal ⁽³⁸⁾. Dados los indicios de que el motivo de la reducción de la actividad citotóxica NK es la expresión por parte del endometrio ectópico de moléculas HLA-G en su superficie, consideramos importante investigar el papel de ciertos polimorfismos en la enfermedad. Los polimorfismos del gen podrían llevar a una reducción de la actividad tolerogénica mediada por el HLA-G. Esto se relacionaría con un ataque más agresivo de las NK a las células ectópicas impidiendo así su proliferación en la cavidad peritoneal, lo que llevaría a una endometriosis con un cuadro clínico menos severo.

Para nuestro estudio, los polimorfismos que nos propusimos analizar fueron: Inserción/delección de 14pb del exón 8 de HLA-G, y el que codifica el alelo nulo HLA-G*0105N, puesto que los dos se han relacionado con variaciones significativas en diversas patologías ginecológicas, como son los abortos recurrentes o la pre-eclampsia. La utilización de la técnica de PCR fue efectiva para la detección y determinación de los polimorfismos en las muestras de DNA.

En relación al polimorfismo de 14pb del exón 8 de HLA-G, estudios demuestran que da lugar a la transcripción de un mRNA frágil. La fragilidad del mRNA da pie a una mayor degradación de este y, por tanto, a la traducción de una cantidad de HLA-G menor de la habitual ^(39,40). Sin embargo, existe controversia entre distintos autores, ya que otros estudios concluyen que este polimorfismo puede tener efectos contradictorios en la expresión de HLA-G y no recomiendan su análisis como marcador de pronóstico ⁽⁴¹⁾. Del mismo modo, nuestros resultados

³⁸ Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninck PRx. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril.* 1991;56:45-51.

³⁹ Shankarkumar U, Shankarkumar A, Chedda Z, Ghosh K. Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients. *J Hum Reprod Sci.* 2011; 4(3): 143–6.

⁴⁰ Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol.* 2003;64(11):1005-10.

⁴¹ Hou W, Huang Z, Ji Z, Zhou J. Human leukocyte antigen-G-14-base-pair-insertion/deletion polymorphism and graft survival in kidney transplant recipients. *Exp Clin Transplant.* 2014 ;12(2):89-94.

parecen indicar que no existe una correlación directa entre la presencia de polimorfismos genéticos y una menor severidad del cuadro clínico.

En cuanto al alelo HLA-G Nulo, la delección de una citosina en la primera base del codón 130 o en la tercera base del codón 129 (mutación 1597 del C) tiene como consecuencia a una variación en el marco de lectura debido a la naturaleza ternaria del código genético. El cambio en la interpretación de la secuencia de nucleótidos provoca la aparición de un codón de terminación en el comienzo del exón 4, lo cual lleva a la traducción de una proteína truncada no funcional ⁽⁴²⁾. Aldrich y colaboradores demuestran que individuos que expresen HLA-G*01:05N tienen una menor capacidad de inducir tolerancia en algunas situaciones ⁽⁴³⁾. La frecuencia de esta mutación en la población española es de 6.1% ⁽⁴⁴⁾, mientras que en nuestro estudio se identificó en 2 de las 15 muestras (13.3%). Por tanto, la frecuencia descrita en mujeres con patología ovárica duplica la de la población general lo cual podría significar que la presencia del polimorfismo es un factor de riesgo que predispone a padecer la enfermedad. Por otro lado, nuestros resultados parecen indicar que la mutación no está relacionada directamente con un cuadro sintomático menos agresivo. Sin embargo, debido al reducido tamaño de nuestra muestra final no podemos descartar la influencia de este en la sintomatología de la endometriosis.

Al estudiar nuestros controles observamos que en dos muestras patología ovárica con diagnóstico de endometriosis negativos evidenciaron la presencia de

⁴² Castro MJ, Morales P, Rojo-Amigo R, Martínez-Laso J, Allende L, Varela, García-Berciano M, Guillen-Perales J, Arnaiz-Villena A. Homozygous HLA-G*0105N healthy individuals indicate that membrane anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival. *Tissue Antigens* 2000; 56: 232-9.

⁴³ Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison, T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, et al. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7 :1167-72..

⁴⁴ Suarez MB, Moralse P, Castro MJ, Fernandez V, Varela P, Alvarez M, et al. A new HLA-G allele (HLA-G *0105N) and its distribution in the Spanish population. *Immunogenetics.* 1997;45:464-5.

los polimorfismos. Puesto que queríamos analizar si los polimorfismos influían en la clínica haciéndola menos grave, comparamos su cuadro clínico con los controles negativos que no presentaron polimorfismos, y observamos una alteración y severidad de los síntomas. Las pacientes con diagnóstico de endometriosis pero sin polimorfismos para HLA-G a nivel genético, presentan una severidad del cuadro clínico debido probablemente a la presencia de la proteína HLA-G soluble. En los casos de endometriosis en los cuales la evolución de la enfermedad es leve se esperaría la presencia de los polimorfismos; en éstos casos en particular sería interesante realizar más estudios para evaluar a que nivel de la vía funcional del HLA-G existe una alteración o disminución de éste a nivel soluble.

Las limitaciones de este estudio incluyen el pequeño número de muestras que cumplían los parámetros y de las que se obtuvo consentimiento para conseguir la historia clínica.

Este estudio complementa un análisis que el grupo de investigación del laboratorio de Andrología del Hospital de San Juan y el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Miguel Hernández han realizado previamente en la detección tanto de la proteína soluble (sHLA-G) por medio de la técnica ELISA como de la proteína total por medio de una técnica más específica como es el Western Blot para su posterior comparación y establecimiento de una correlación entre la proteína HLA-G, además del gen y sus polimorfismos, y su papel en las diferentes enfermedades ováricas.

7. CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR fue eficaz para la detección y determinación de los polimorfismos en las muestras de DNA de los controles y pacientes con diagnóstico de endometriosis.
2. Tanto la presencia del polimorfismo de Inserción/delección de 14pb del exón 8 de HLA-G, como la mutación 1597 del C no mostraron relación con la sintomatología de la endometriosis.
3. El porcentaje de pacientes con alteraciones génicas y endometriosis en nuestra serie concuerda con el esperado. Para considerar estas variaciones génicas en HLA-G como marcador pronóstico se debe realizar un estudio con mayor número de casos y controles sanos.



8. ANEXOS

ANEXO 1:

Numero	Tipo de Muestra	R 260/280 (nm)	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	S	1.39	2.6
2	S	1.69	3.6
3	S	2.13	5.6
4	S	2.00	6.9
5	S	1.91	7.0
6	S	1.59	4.4
7	LP	2.07	6.1
8	LE	1.24	8.7
9	LP	2.29	4.2
10	LP	1.90	6.4
11	LP	1.76	7.0
12	S	1.97	1.9
13	S	2.87	1.6
14	LP	1.69	5.7
15	S	2.40	1.8
16	S	1.43	5.7
17	S	1.24	5.6
18	S	1.68	5.0
19	S	-	-
20	LP	1.26	7.2

21	S	1.40	4.0
22	S	1.14	2.6
23	S	1.40	4.0
24	S	1.17	5.1
25	LP	1.15	8.8
26	LP	1.41	6.4
27	LP	1.27	6.0
28	LP	1.29	8.0
29	S	1.33	6.9
30	LP	1.45	5.9
31	S	1.46	11.6
32	S	1.35	7.4
33	LP	1.55	2.3
34	LP	1.37	5.0
35	S	1.51	7.9
36	S	1.45	7.5
37	LP	1.57	3.7
38	LP	1.31	2.2
39	LP	1.77	5.0
40	LP	1.17	10.6
41	LP	1.38	5.4
42	S	1.58	10.7
43	S	1.47	10.7
44	S	1.41	8.5

45	S	1.14	3.7
46	S	1.51	3.5
47	S	1.6	4.1
48	S	1.37	10.0
49	S	1.74	4.0
50	S	1.39	3.1
51	S	1.27	4.4
52	S	1.52	4.2
53	LP	1.36	11.9
54	LP	1.47	14.1
55	LE	1.44	8.5
56	LP	4.36	-2.8
57	LQ	1.66	1.8
58	S	4.24	1.4
59	LP	2.35	1.7
60	S	9.88	1.4
61	LP	3.34	3.3
62	S	2.15	3.4
63	S	1.41	10.1
64	S	14.71	1.0
65	S	1.60	2.1
66	S	1.84	2.3
67	LP	1.09	4.5
68	LE	1.45	3.5

69	LE	2.98	2.6
70	S	1.46	1.6
71	LP	2.11	5.4
72	LP	0.96	0.8
73	S	5.86	1.0
74	LP	1.01	6.9
75	LP	1.62	2.5
76	LP	3.01	2.8
77	LQ	2.08	1.6
78	S	4.73	0.6
79	LP	1.39	0.8
80	LP	1.37	1.4
81	S	-6.75	1.7
82	S	1.39	1.9
83	S	2.68	2.4

Tabla 7: Cuantificación de DNA presente en 83 muestras y análisis de la pureza de este usando la relación entre absorbancia $\lambda=260$ y absorbancia $\lambda=280$.

Abreviaturas: S (suero), LP (líquido peritoneal), LE (líquido endometrial) y LQ (líquido de quiste).