

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

“Expresión de ligandos para las células *Natural
Killer* en el endometrio: comparación entre
mujeres afectas de endometriosis y mujeres no
afectas”

Tesis doctoral presentada por
Dña. María del Mar Vernet Tomás, para optar al grado de Doctora en Medicina
y Cirugía

Barcelona, Abril 2003

Don CARLOS TOMÁS PÉREZ ARES, Profesor Asociado de Obstetricia y Ginecología, de la Universidad Autónoma de Barcelona, en calidad de director de la tesis

CERTIFICA:

Que Doña MARÍA DEL MAR VERNET TOMÁS, licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección la memoria que presenta con el título “**Expresión de ligandos para las células Natural Killer en el endometrio: comparación entre mujeres afectas de endometriosis y mujeres no afectas**”, que reúne los requisitos para ser defendida ante el tribunal oportuno y puede optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía.

Y para que conste a petición del interesado, firmo el presente certificado en Barcelona, a 23 de Abril del dos mil tres.

Fdo: Carlos Tomás Pérez Ares

Dedicado a:

Mi marido, Alberto, porque le amo.

A nuestro hijo Álex, por la alegría que nos da a los dos cada día.

A mis padres, Miquel y María, por estar siempre ahí, para mí.

A mis hermanas, Montse y Xell, por la complicidad que nos une a las tres, mucho más
allá de los lazos de sangre.

A mi hermano, Miquel, para que la distancia siga siendo, como hasta ahora, sólo una
cuestión geográfica.

A todos, con mucho más cariño del que jamás les he sabido expresar.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Carlos Pérez Ares, el tutor de esta tesis, no sólo por haberme animado a iniciar esta tesis y haberla dirigido, sino por todo lo que aprendí a su lado durante la residencia.

Al Dr. Ramón Carreras, tutor de esta tesis y mi actual jefe de Servicio, por haberme dado el impulso y apoyo necesarios, en momentos de franco pesimismo, para continuarla y finalizarla.

A la Dra. Nuria Verdú, por haberse entusiasmado con nuestro proyecto, habernos infundido optimismo para realizarlo y habernos ayudado activamente en él.

A la Dra. Maite Fernández, al Dr. José Luís Molinero y a la técnica Geli Fernández, los tres del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Germans Trias i Pujol, por todo lo que pacientemente tuvieron que enseñarnos para realizar esta tesis y las correcciones que en los aspectos técnicos llevaron a cabo.

Al Profesor Ricardo Pujol, jefe de Servicio de Inmunología del Hospital Germans Trias i Pujol, por sus ideas para iniciar el proyecto y sus desinteresadas donaciones de anticuerpos monoclonales; al Profesor Sánchez-Madrid, del Hospital Gregorio Marañón de Madrid y al Profesor Ramon Vilella, del Hospital Clínico y Provincial del Barcelona, por sus donaciones desinteresadas de anticuerpos monoclonales.

Al Sr. Joan Vila, del IMIM, por el apoyo y las ideas prestados en el estudio estadístico de esta tesis.

A todo el Servicio de Ginecología del Hospital Germans Trias i Pujol, por la colaboración prestada en la recogida de muestras en quirófano y en la realización de todo el trabajo. Muy especialmente a mi jefe de Servicio durante la residencia, Profesor Oriol Gamissans, por haberme infundido un estricto sentido del método científico y a mi tutor durante la residencia, Dr. Emilio Pérez Picañol, por haber escuchado mis preocupaciones con interés, durante la residencia y después de ella.

A todo el Servicio de Ginecología del Hospital del Mar, por la sobrecarga asistencial que por amistad han asumido en muchas ocasiones, para que yo pudiera dedicar tiempo a la realización de esta tesis. Muy especialmente a los residentes senior, Dra. María Prat, Dr. Ricard Peiró y Dra. Carolina Rueda, que por rotación y guardias han asumido gran parte de esta carga, y al Dr. Josep Sales, adjunto del Servicio y colega en consulta externa: todos ellos me han proporcionado afectuosamente este tiempo tan precioso y con frecuencia tan difícil de conseguir.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ENTIDAD CLÍNICA	3
1.1.1. <i>Definición y epidemiología de la endometriosis.</i>	3
1.1.3. <i>Aspectos clínicos de la endometriosis</i>	10
1.1.3. <i>Diagnóstico y estadiaje de la endometriosis</i>	22
1.1.4. <i>Tratamiento de la endometriosis</i>	28
1.2. EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS.....	35
1.2.1. <i>Teorías etiopatogénicas sobre el origen de la endometriosis.</i>	35
1.2.2. <i>Alteraciones fisiopatológicas en la endometriosis.</i>	42
1.2.3. <i>Las alteraciones en las células Natural Killer y el origen de la endometriosis.</i>	53
2. JUSTIFICACIÓN	71
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	77
3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	79
3.2. OBJETIVOS	80
4. MATERIAL Y MÉTODO	81
4.1. INCLUSIÓN DE PACIENTES.....	83
4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	86
4.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	87
4.4. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS	90

4.5. FASES DEL ESTUDIO: ESTUDIO PILOTO Y ESTUDIO DEFINITIVO ...	91
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	92
5. RESULTADOS.....	95
5.1.- DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN SOMETIDA A ESTUDIO	97
5.1.1. <i>Antecedentes familiares y personales.....</i>	97
5.1.2. <i>Enfermedad actual y tratamiento.....</i>	100
5.2.- RESULTADO DEL ESTUDIO PILOTO	101
5.2.1. <i>Expresión de LFA-3 (y CD2).....</i>	101
5.2.2. <i>Expresión de ICAM-1 (y LFA-1).....</i>	105
5.2.3. <i>Expresión de $\alpha 6\beta 4$.....</i>	109
5.2.4. <i>Expresión de HLA-I.....</i>	111
5.3. ESTUDIO DEFINITIVO: EXPRESIÓN DE $\alpha 6\beta 4$	115
5.3.1 <i>Distribución de casos y controles en función de la fase del ciclo.....</i>	115
5.3.2. <i>Resultado en la expresión de $\alpha 6\beta 4$ comparando todas las muestras.....</i>	116
5.3.3. <i>Expresión de $\alpha 6\beta 4$ comparando las muestras en fase proliferativa.....</i>	118
5.3.4. <i>Expresión de $\alpha 6\beta 4$ comparando las muestras en fase secretora.....</i>	119
5.3.5. <i>Comparación entre fase proliferativa y fase secretora del grupo Endometriosis.....</i>	121
5.4.- ESTUDIO DEFINITIVO: EXPRESIÓN DE HLA I	125
5.4.1 <i>Distribución de casos y controles en función de la fase del ciclo.....</i>	125
5.4.2. <i>Resultado en la expresión de HLA I comparando todas las muestras.....</i>	126
5.4.3. <i>Expresión de HLA I comparando las muestras en fase proliferativa.....</i>	131
5.4.4. <i>Expresión de HLA I comparando las muestras en fase secretora.....</i>	132
5.4.5. <i>Comparación entre fase proliferativa y fase secretora del grupo Endometriosis.....</i>	134

5.5. ESTUDIO DEFINITIVO: CONCORDANCIA ENTRE LAS ALTERACIONES	137
6. DISCUSIÓN	143
6.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO	145
6.2. LA EXPRESIÓN DE LFA-3	151
6.3. LA EXPRESIÓN DE ICAM-1	153
6.4. LA EXPRESIÓN DE $\alpha 6\beta 4$	155
6.5. LA EXPRESIÓN DE HLA I	163
6.6. LA CONCORDANCIA ENTRE LAS ALTERACIONES	171
7. CONCLUSIONES.....	175
8. BIBLIOGRAFÍA.....	181
9. ANEXOS.....	225
ÍNDICE DE TABLAS.....	227
ÍNDICE DE FIGURAS	229
ABREVIACIONES	231

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ENTIDAD CLÍNICA

1.1.1. Definición y epidemiología de la endometriosis.

Definimos como endometriosis la aparición de glándulas endometriales y/o estroma fuera del útero. En esta definición no incluimos la adenomiosis por tratarse de una enfermedad cuya clínica es muy distinta de la endometriosis, constituyendo probablemente entidades diferenciadas (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999) : en este caso la implantación se produce también fuera de la cavidad endometrial pero dentro del útero, dado que en la adenomiosis aparecen glándulas y estroma miometrial afectando al miometrio.

Las primeras descripciones de la endometriosis se hallan en la literatura médica hacia el 1800 pero hasta el siglo XX no se aprecia realmente la incidencia de la enfermedad (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999). En 1921 John Sampson, de Albany, en Nueva York, sugirió que la endometriosis pélvica provenía de diseminación a partir de endometriosis ovárica y más tarde, en 1927, publicó un artículo (Sampson J. A. 1927) en el que defendía la teoría de que la endometriosis se iniciaba por flujo menstrual retrógrado, teoría todavía válida en el momento actual como veremos más adelante.

La endometriosis representa un problema de salud pública relevante: es la tercera causa de hospitalización de causa ginecológica y una de las principales indicaciones para proceder a histerectomía según datos de Velebil P et al. (Velebil P., Wingo P. A. et al.

1995). Es difícil conocer la incidencia y prevalencia reales de la enfermedad, por lo que las cifras publicadas oscilan entre un 3 y un 10% en la población general, un 25 a un 35% considerando mujeres que consultan por infertilidad (Olive D. L. y Schwartz L. B. 1993; Witz C. A. 1999), hasta incluso un 50% en adolescentes que consultan por dismenorrea que no cede con tratamientos habituales (Cramer D. W. y Missmer S. A. 2002). Estas diferencias se deben a la selección de casos y controles, así como a los criterios tomados para considerar que una paciente presenta endometriosis. Si se intenta establecer la prevalencia en la población general tomando pacientes sintomáticas intervenidas, ésta puede sobrevalorarse (25% de las pacientes sometidas a laparoscopia por dolor pélvico, 20% de las pacientes sometidas a laparoscopia por infertilidad) dado que no se incluirán endometriosis leves-moderadas que no llegarán a consultar por presentar escasa sintomatología; por el contrario se infravalorará si se toman pacientes asintomáticas sometidas a ligadura tubárica en las que se observa en un 4.1% y sólo se diagnosticarán los estadios más benignos (Eskenazi B. y Warner M. L. 1997). Dado que tomar sólo las pacientes intervenidas como afectas representa un sesgo, algunos autores intentaron estimar la prevalencia en la población general recogiendo no sólo las pacientes en las que se diagnosticó endometriosis en una intervención, sino también aquellas que presentaban una exploración compatible con la enfermedad, como Houston et al. (Houston D. E., Noller K. L. et al. 1987) o que referían una sintomatología compatible, como Kjerulff et al. (Kjerulff K. H., Erickson B. A. et al. 1996). La crítica a estos trabajos es evidente: ni se puede asegurar que presentaran endometriosis los casos ni se podía descartar en los controles. En estos trabajos la prevalencia oscilaba entre 2.5-6.9%. Según Eskenazi et al. (Eskenazi B. y Warner M. L. 1997), sólo se sabrá la incidencia real cuando se halle un marcador biológico no invasivo para su diagnóstico. Según Evers et al. (Evers J. L., Land J. A. et al. 1998), la incidencia

de la endometriosis es universal en tanto que se trata de un trastorno que cualquier mujer puede presentar en algún momento de su vida, con fases de agudización y remisión espontáneas.

Existen innumerables publicaciones sobre factores de riesgo para la endometriosis, pero pocos estudios reúnen las condiciones de estudios epidemiológicos bien estructurados. Eskenazi et al. revisaron unos 100 estudios sobre el tema y hallaron sólo 12 autores hasta 1999 que habían publicado trabajos con las condiciones necesarias en un estudio epidemiológico: estudio de cohortes o caso-control, casos de endometriosis confirmados por cirugía, criterios de selección de controles claramente definidos y análisis ajustado por potenciales factores de confusión (Eskenazi B. y Warner M. L. 1997).

Los factores de riesgo para la endometriosis considerados hasta el momento son:

- La edad: la endometriosis se limita a los años reproductivos, incrementándose el riesgo a partir de los 36 años (Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995) con una máxima incidencia entre los 40 y 44 años (Vessey M. P., Villard-Mackintosh L. et al. 1993).
- Étnicos: sólo el estudio de Sanghi-Haghpeykar y Poindexter (Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995) encontró asociación con la raza asiática con una odds ratio (OR) de 8.6 (IC del 95%, 1.4-20.7).

- Clase social: sólo el estudio de Makhoul Obermeyer et al. encontró una asociación positiva entre clase socioeconómica alta y endometriosis (Makhoul Obermeyer C., Armenian H. K. et al. 1986). Los propios autores pensaron que podía tratarse de un sesgo por el menor acceso a la cirugía y a los servicios médicos en general de las clases más desfavorecidas.
- Características menstruales: en varios estudios se ha asociado el riesgo de endometriosis a aquellos factores que suponían una exposición aumentada a la menstruación, esto es, ciclos cortos, larga duración del flujo, menor paridad etc. En su estudio, Cramer et al. hallaron mayor riesgo para aquellas pacientes con ciclos cortos, flujo duradero, dismenorrea, flujo abundante, y mayor número de tampones y compresas utilizados (Cramer D. W., Wilson E. et al. 1986). Darrow et al. hallaron una incidencia significativamente mayor entre los casos menores de 30 años con flujo menstrual superior a 6 días, flujo abundante, dismenorrea severa, dismenorrea progresivamente más intensa y uso de tampones más de 14 años: la frecuencia de estas características era mayor pero no significativa para pacientes mayores a 30 años (Darrow S. L., Vena J. E. et al. 1993). Parazzini et al. observaron mayor riesgo de endometriosis entre mujeres con ciclos irregulares, menor paridad y menos interrupciones voluntarias del embarazo (Parazzini F., Ferraroni M. et al. 1994). Sanghi-Haghpeykar et al. observaron que los casos con endometriosis presentaban periodos de más de 6 años sin interrupción de menstruaciones y tendían a menor paridad: de forma contradictoria, presentaban ciclos prolongados pero los propios autores lo atribuyeron a que se trataba de endometriosis leves o moderadas halladas en una ligadura tubárica (Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995).

- Anticoncepción: en cuanto al uso de métodos anticonceptivos, se ha relacionado el uso de anticonceptivos orales en el pasado con el riesgo de endometriosis (Vessey M. P., Villard-Mackintosh L. et al. 1993; Parazzini F., Ferraroni M. et al. 1994; Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995) pero los autores en sus publicaciones coincidían en que se podía tratar de un sesgo, en tanto que los anticonceptivos enmascaran los síntomas de la endometriosis y se administran frecuentemente para tratar la dismenorrea, retrasando su diagnóstico al momento en que se abandonan. En cuanto al uso de DIU, Vessey et al. (Vessey M. P., Villard-Mackintosh L. et al. 1993) hallaron mayor riesgo para usuarias del método en el pasado (no en actuales), atribuyendo también el hallazgo a un sesgo en tanto que las algias son motivo de retirar el dispositivo; Parazzini et al. no hallaron relación con el uso de DIU en el presente ni en el pasado (Parazzini F., Ferraroni M. et al. 1994) y Sanghi-Haghpeykar et al. sí hallaron mayor riesgo de endometriosis para un uso entre dos y cuatro años (Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995). Ningún autor ha hallado relación entre los métodos barrera y la aparición de la enfermedad.
- Estilo de vida: los hábitos de vida que se asocian a una disminución en los niveles de estrógenos se han relacionado con una menor incidencia de endometriosis. Así lo referían Cramer et al. (Cramer D. W., Wilson E. et al. 1986) y Darrow et al. (Darrow S. L., Selman S. et al. 1994) en sus estudios, relacionando tabaquismo severo de inicio temprano (antes de los 17 y 16 años respectivamente) y menor incidencia de endometriosis. También el ejercicio físico podría proteger frente a la endometriosis: más de dos horas por semana iniciándolo antes de los 25 años, según Cramer et al. (Cramer D. W., Wilson E. et al. 1986), aunque el autor comentaba en su trabajo que el sesgo se podía producir en este caso porque las pacientes con endometriosis

tendrían dificultad para realizar ejercicio físico a causa del dolor abdominal. Otros hábitos de vida se han relacionado con una mayor incidencia de endometriosis, como son la ingesta de café y la ingesta de alcohol (Grodstein F., Goldman M. B. et al. 1993; Grodstein F., Goldman M. B. et al. 1994) : los autores reconocían que podía haber un sesgo por reducción voluntaria de café y del enolismo en mujeres gestantes, en lactancia materna o en mujeres con niños pequeños, que no se habría dado en mujeres infértiles con endometriosis.

- Distribución corporal de la grasa: la distribución de la grasa también se ha relacionado con el riesgo de endometriosis. Darrow et al. hallaron mayor riesgo en las mujeres con obesidad periférica que con obesidad central, aunque sólo en menores de 30 años y lo relacionaban con un mayor nivel de estrógenos en ellas. El hecho de que no se hallara la misma relación en mujeres de más de 30 años lo atribuyeron a un incremento del perímetro de las caderas habitual a partir de esta edad (Darrow S. L., Selman S. et al. 1994).

- Factores genéticos: en un estudio de Simpson et al., el 6.9% de familiares de una paciente afecta presentaron la enfermedad frente al 1% del grupo control (Simpson J. L., Elias S. et al. 1980). Es también notable la concordancia en la aparición de la enfermedad entre gemelas monocigotas (Hadfield R. M., Mardon H. J. et al. 1997). Un reciente estudio caso-control de Stefansson et al. en Islandia, basado en 750 casos de endometriosis, observó una OR de 5.20 (intervalo de confianza –IC- del 95%, 3.4-7.16) para hermanas y de 1,56 (IC de confianza del 95%, 1.13-1.93) para primas de primer grado (Stefansson H., Geirsson R. T. et al. 2002). Esta posible base genética se halla actualmente en investigación sin conclusiones todavía válidas.

Se impulsan estudios desde Internet, con la creación reciente por parte de Zondervan et al. (Zondervan K., Cardon L. et al. 2002), de la Universidad de Oxford, Gran Bretaña, de una base de datos abierta a la participación internacional. En ella se recoge toda la información existente sobre las alteraciones genéticas que se han estudiado en la endometriosis.

1.1.3. Aspectos clínicos de la endometriosis

Un porcentaje variable de pacientes afectas de endometriosis permanece sin síntomas o con síntomas mínimos y la enfermedad se diagnostica en el curso de una laparoscopia o laparotomía por cualquier otra causa. Los síntomas que con más frecuencia llevan al diagnóstico de endometriosis son el dolor, la esterilidad primaria o secundaria y la sintomatología específica asociada a localizaciones extrapélvicas de la endometriosis.

Para algunos autores todo lo publicado sobre sintomatología de la endometriosis se basa excesivamente en pacientes diagnosticadas quirúrgicamente, con enfermedad progresiva y que requieren intervenciones repetidas (Simpson J. L., Elias S. et al. 1980; Jansen R. P. y Russell P. 1986). Pero la enfermedad no sólo puede ser asintomática, sino incluso transitoria y autolimitada en muchas pacientes (Evers J. L., Land J. A. et al. 1998), con un espectro de síntomas mucho más amplio que el descrito en muchos tratados (Martín D. C. y Ling F. W. 1999): esto parece confirmarse en trabajos en los que se observaba que entre el 64 y el 67% de pacientes diagnosticadas de endometriosis en un estudio por esterilidad no presentaban síntoma alguno (Moen M. H. 1995). El que se trata de una enfermedad en ocasiones transitoria se ve apoyado por el estudio de Fedele et al., en el que describen una tasa del 27% de remisión espontánea de la dismenorrea y de las lesiones en pacientes diagnosticadas de endometriosis (Fedele L., Bianchi S. et al. 1993). Con todos estos datos se concluye que la endometriosis puede ser en ocasiones asintomática, en otras episódica y autolimitada en la vida de una mujer, siendo una enfermedad infradiagnosticada ante dolor pélvico inespecífico que se

controlará con tratamiento médico (hormonal o analgésico), sin un diagnóstico ni tan siquiera de sospecha. Ello no nos tiene que hacer perder de vista que el 63% de las endometriosis diagnosticadas progresa y por tanto el hallazgo de una endometriosis implica su tratamiento (Fedele L., Bianchi S. et al. 1993).

Endometriosis y dolor

Clásicamente se ha dicho que hay que sospechar endometriosis ante una dismenorrea y/o una dispareunia profunda, especialmente si éstas son claramente secundarias, después de varios años de menstruaciones y relaciones normales. También el dolor pélvico inespecífico, sin relación con menstruaciones o relaciones sexuales, puede ser un signo de endometriosis, sea difuso o localizado, con frecuencia en el recto. Las pacientes pueden referir también dolor lumbar. Se cree que la intensidad del dolor suele estar más en relación con la profundidad de la invasión de los implantes que con la extensión de la enfermedad y así mismo que la enfermedad de localización central suele causar más sintomatología que la de localización lateral. Martin et al. relacionaron no la intensidad del dolor, sino la persistencia de éste con el estadio de la enfermedad (Martin D. C. y Ling F. W. 1999).

El síntoma álgico más frecuente es la dismenorrea, muy inespecífico sobretodo en pacientes jóvenes, que presentan dismenorrea primaria con mucha frecuencia, conllevando en ocasiones importantes retrasos en el diagnóstico. Se sospechará endometriosis en dismenorreas de duración e intensidad superior a lo normal. Según Muzii et al., existe una buena correlación entre la severidad de la dismenorrea, el estadio

de la endometriosis, la profundidad de las lesiones y el número de adherencias (Muzii L., Marana R. et al. 1997).

El dolor localizado en una topografía concreta de la pelvis se ha relacionado sobretodo con lesiones endometriósicas fibróticas, relativamente antiguas, especialmente con la profundidad de éstas y con su volumen (Ripps B. A. y Martin D. C. 1992). Según L. Demco en lesiones superficiales el dolor localizado se relaciona con la actividad y vascularización de la lesión (Demco L. 1998). Para algunos autores el diagnóstico de focos endometriósicos dolorosos se facilita si la exploración de la paciente se realiza durante la menstruación (Koninckx P. R., Meuleman C. et al. 1996)

Un dolor característico en la endometriosis es el que se despierta especialmente durante el acto sexual (dispareunia profunda). No se suele producir en casos de endometriosis ovárica aislada y sí especialmente en casos de implantes en fondo de saco de Douglas. Casos más excepcionales de endometriosis vaginal se asocian también a dispareunia (Martin D. C. y Ling F. W. 1999).

El dolor pélvico crónico, definido como un dolor no cíclico de 6 meses o más de duración, se ha relacionado también con la existencia de endometriosis. El hecho de que hasta en un tercio de laparoscopias por dolor pélvico crónico no se halle patología orgánica alguna, ha hecho pensar a algunos autores que implantes mínimos de endometriosis podrían haber sido ignorados (Martin D. C. y Ling F. W. 1999). Para W. Hurd sólo se puede atribuir el dolor pélvico crónico a la endometriosis si se cumplen tres condiciones: el dolor tiene un mínimo componente cíclico o al menos empeora durante las menstruaciones, se ha diagnosticado la endometriosis durante un acto

quirúrgico y el tratamiento médico o quirúrgico de la endometriosis ha supuesto algún tipo de mejoría (Hurd W. W. 1998).

Endometriosis, esterilidad e infertilidad.

La asociación entre endometriosis, esterilidad e infertilidad es aceptada desde que se empezó a definir la enfermedad a principios del siglo XX. Hallamos en la literatura que del 25 al 50 % de las pacientes infértiles presentan endometriosis y que del 30 al 50% de pacientes con endometriosis serán infértiles (Burns W. N. y Schenken R. S. 1999). En casos de endometriosis severa en los que existe una clara distorsión anatómica pocas dudas hay respecto a su influencia sobre la fertilidad, pero más controvertida es esta asociación en los casos de endometriosis leve o moderada, que son la mayoría, en los que la alteración macroscópica de genitales internos es escasa o nula. La incidencia de esterilidad en la endometriosis se basó inicialmente en estudios de los años 30 y 40. Ni por metodología ni por la época estos estudios son trasladables a la actualidad. Posteriormente a partir de los años 70, al iniciarse la laparoscopia, empezaron a publicarse estudios retrospectivos comparando la incidencia en pacientes estériles y en pacientes sometidas a ligadura tubárica, concluyendo que las primeras presentaban con más frecuencia endometriosis; estos estudios presentan sesgos importantes que ponen en duda su validez (Burns W. N. y Schenken R. S. 1999). Estudios posteriores en los años 80 y 90 valoraron la eficacia de técnicas reproductivas por factor masculino en mujeres afectas y no afectas de endometriosis, observando mejores resultados en las no afectas, como el de Jansen et al. (Jansen R. P. 1986) y Byrd et al. (Byrd W., Bradshaw K. et al. 1990), aunque el número de pacientes incluídas fue bajo, por lo que difícilmente

son resultados generalizables por criterios de medicina basada en la evidencia. Dos estudios españoles, de Portuondo et al. (Portuondo J. A., Echanojauregui A. D. et al. 1983) y Rodríguez-Escudero et al. (Rodríguez-Escudero F. J., Neyro J. L. et al. 1988), pusieron en duda esta asociación de endometriosis mínima o moderada y esterilidad, con resultados en técnicas de inseminación artificial comparables a los obtenidos en mujeres sanas. Tal vez el estudio más significativo en este aspecto es el del *Canadian Collaborative Group on Endometriosis*, liderado por S. Marcoux, en el que randomizaron pacientes con endometriosis mínima y moderada para laparoscopia exploradora o laparoscopia quirúrgica con resección de implantes, demostrando una tasa de embarazos significativamente mayor en el grupo tratado (Marcoux S., Maheux R. et al. 1997). Se desprende de este estudio que efectivamente la endometriosis, aún mínima, produce esterilidad.

La impresión del clínico, más o menos avalada por la literatura publicada, es que una paciente con endometriosis es una paciente con alto riesgo para presentar esterilidad y al contrario, que ante una esterilidad no atribuible a otras causas, la endometriosis puede ser la determinante. Los factores que se han estudiado y que podrían explicar esta relación son:

- Distorsión anatómica: producida por los endometriomas o las adherencias consecuencia de la enfermedad (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999).

- Alteraciones en el ciclo menstrual y ovárico: oligoanovulación (Matorras R., Rodríguez F. et al. 1996), insuficiencia lútea (Lessey B. A. y Young S. L. 1997; Burns W. N. y Schenken R. S. 1999), menor expresión de una molécula de adhesión -la

integrina $\alpha_v\beta_3$ en la ventana de implantación (Lessey B. A. y Young S. L. 1997), cambios en la producción hormonal y alteraciones en el tamaño de los folículos (Ledger W. L. 1999).

- Niveles de prolactina: aunque algunos estudios habían descrito niveles de prolactina elevados en la endometriosis, estudios posteriores han dado resultados contradictorios (Matalliotakis I., Panidis D. et al. 1996; Burns W. N. y Schenken R. S. 1999).
- LUF (por *Luteinized Unruptured Follicle Syndrome*): la asociación entre endometriosis y “síndrome del folículo luteinizado y no roto”, LUF por *Luteinized Unruptured Follicle Syndrome* en inglés, ha estado en controversia durante varios años. Un trabajo de Mio et al., en el que se utilizaban criterios ecográficos para diagnosticar LUF, demostraron que efectivamente se producía más frecuentemente en los casos de endometriosis, 24% frente a un 6% de controles (Mio Y., Toda T. et al. 1992). Otros autores hallaron mediante estudios parecidos menor incidencia (Burns W. N. y Schenken R. S. 1999) por lo que el tema todavía está en controversia.
- Anticuerpos antiendometriales y activación policlonal no específica de linfocitos B: varios estudios describieron una mayor incidencia de anticuerpos antiendometriales en la endometriosis, postulándose que éstos podrían alterar la implantación (Martinez-Roman S., Balasch J. et al. 1997). Otros autores han visto que en pacientes estériles sin endometriosis los niveles de anticuerpos antiendometriales son también elevados (Odukoya O., Bansal A. et al. 1996). Actualmente se estudian determinados epítomos endometriales y la existencia de anticuerpos contra ellos

(Yeaman G. R., Collins J. E. et al. 2002). En cuanto a la activación policlonal no específica de linfocitos B, si bien se hipotetizó que podía ser uno de los mecanismos, la asociación con enfermedades que la presentan como el lupus eritematoso no llega a la significación (Kilpatrick D. C., Haining R. E. et al. 1991).

- Macrófagos peritoneales: varias publicaciones han demostrado que efectivamente existe una respuesta peritoneal inflamatoria exacerbada en la endometriosis, sobretodo a expensas de los macrófagos peritoneales tal como revisan Santanam et al. Un aspecto que se ha investigado es cómo afecta esta respuesta inflamatoria peritoneal, sea causa o consecuencia de la enfermedad, a la esterilidad. Los resultados de estos estudios han sido contradictorios y en todo caso todavía no hay conclusiones definitivas al respecto (Santanam N., Murphy A. A. et al. 2002).
- Prostaglandinas en el líquido peritoneal: existen tantos estudios que hallan diferencias en los niveles de prostaglandinas en líquido peritoneal entre pacientes con endometriosis y controles como estudios que no las encuentran (Zahradnik H. P., Schafer W. et al. 1992) con lo que no hay ideas claras al respecto. En estos últimos diez años no se han publicado trabajos significativos sobre prostaglandinas y endometriosis.

Otra cuestión es la asociación entre endometriosis y abortos de repetición: en los años 80, varias publicaciones establecieron esta asociación basándose en estudios retrospectivos y sin grupo control (Groll M. 1984). Estudios posteriores, mejor diseñados y controlados, no la han confirmado: así en un estudio español de

Matorras et al. (Matorras R., Rodriguez F. et al. 1998), relativamente reciente, no se evidenciaron diferencias en la tasa de abortos entre pacientes con endometriosis y otras pacientes estériles.

Endometriosis extrapélvica

Según G. Honoré se han descrito implantes endometriósicos en casi cualquier topografía excepto corazón y bazo (Honore G. M. 1999). Su incidencia real es desconocida y desde luego mucho más excepcional que la endometriosis pélvica. Para Singh et al. la edad de diagnóstico podría ser de media algo más tardía que en los casos de endometriosis pélvica, entre 34 y 40 años, mientras que en la endometriosis pélvica es entre 25-30 años (Singh K. K., Lessells A. M. et al. 1995). Se discutirá en el capítulo de *El origen de la endometriosis* la causa de estos implantes. Markham et al. propusieron una clasificación para las pacientes afectas de endometriosis extrapélvica: la *clase I* en la endometriosis gastrointestinal, la *clase U* en la de tracto urinario, la *clase L* en la torácica y la *clase O* en el resto de ubicaciones. A su vez subdividieron la endometriosis en intrínseca o extrínseca y según el tamaño de la lesión. Con ello se pretendía unificar criterios para el estudio de los distintos casos publicados en todo el mundo, aunque en realidad esta clasificación no se ha generalizado (Markham S. M., Carpenter S. E. et al. 1989).

El aparato digestivo es la localización más frecuente de endometriosis extrapélvica y de hecho entre un 5-15% de los casos de endometriosis pélvica tiene algún tipo de afectación del tracto gastrointestinal (Prystowsky J. B., Stryker S. J. et al. 1988). Las

localizaciones más frecuentes son, en orden decreciente: recto, sigma, apéndice, íleo, yeyuno y ciego (Bergqvist A. 1992). La endometriosis en tracto gastrointestinal puede ser un hallazgo casual en una laparotomía o laparoscopia por otro motivo: hasta el 50% de las pacientes son asintomáticas en los casos de afectación de intestino delgado (Honore G. M. 1999). En las pacientes que presentan sintomatología, ésta puede ser cíclica al inicio de la enfermedad aunque posteriormente las lesiones fibróticas la convertirán en continua y suele deberse a obstrucción (Zwas F. R. y Lyon D. T. 1991).

La endometriosis del aparato urinario es la segunda en frecuencia de las localizaciones extrapélvicas (Honore G. M. 1999). Suele ir asociada a la existencia de una endometriosis pélvica aunque se han descrito casos de sólo endometriosis urinaria en pacientes con un antecedente de cirugía pélvica, especialmente cesáreas (Honore G. M. 1999). La localización más frecuente es la vesical con el 80% de los casos, seguida de la ureteral con el 10-15% de los casos (Honore G. M. 1999). Los síntomas más frecuentes son dolor en la región vesical y dificultades en la micción, especialmente durante la menstruación.

Existen en la literatura más de 100 casos descritos de endometriosis pleural y pulmonar (Honore G. M. 1999). Suelen ser lesiones únicas aunque Foster et al. han descrito casos de diseminación miliar (Foster D. C., Stern J. L. et al. 1981). El lado derecho es donde se produce con más frecuencia y de éste, la superficie diafragmática de la pleura (Elliot D. L., Barker A. F. et al. 1985). En el 80% de los casos coexiste una endometriosis pélvica, sobre todo si la afectación es pleural; en los casos de afectación pulmonar la presentación aislada con o sin el antecedente de cirugía uterina es más frecuente (Honore G. M. 1999). La clínica más común es el neumotórax catamenial.

Más raramente se produce un hemotórax con la menstruación o incluso una hemoptisis cíclica en casos de afectación parenquimatosa.

La localización más habitual de endometriosis cutánea es en la pared abdominal, sobretodo en la zona umbilical y siempre en relación a cicatrices previas (Brenner C. y Wohlgemuth S. 1990). En la región inguinal se han descrito sin relación a cicatrices (Purvis R. S. y Tying S. K. 1994). La intervención previa suele ser una incisión sobre un útero grávido: al parecer es más frecuente en uterotomías practicadas para interrumpir una gestación en el segundo trimestre que en cesáreas a término (Bergqvist A. 1992). También se ha descrito endometriosis de pared abdominal relacionadas con trayectos de trócares para laparoscopia (Brenner C. y Wohlgemuth S. 1990; Purvis R. S. y Tying S. K. 1994; Healy J. T., Wilkinson N. W. et al. 1995) e incluso en el trayecto de una aguja después de una amniocentesis (Ferrari B. T. y Shollenbarger D. R. 1977; Kaunitz A. y Di Sant'Agnese P. A. 1979).

La endometriosis puede producirse también en genitales externos, vagina y cérvix. Se pueden hallar nódulos endometriósicos en vagina aunque posiblemente es una patología infradiagnosticada por ser muchos casos asintomáticos: (Honore G. M. 1999). En los sintomáticos, se suele producir dispareunia y metrorragia postcoital. La afectación en el cérvix se ha descrito aislada y asociada a afectación de tabique rectovaginal y suele ser asintomática. Los focos endometriósicos en la zona perineal y perianal aparecen en la mayoría de casos en una episiotomía y la clínica suele ser un nódulo doloroso con exacerbaciones del dolor durante la menstruación (Paull T. y Tedeschi L. G. 1972).

Se ha descrito endometriosis en el pubis, glúteos, tobillo, rodilla, hombro, codo, antebrazo y mano (Honore G. M. 1999). Existen una veintena de casos descritos de cialgia menstrual en relación a endometriosis del nervio ciático (Papapietro N., Gulino G. et al. 2002), tratados con liberación quirúrgica del nervio y hormonoterapia con más o menos éxito. Hay tres casos de endometriosis del nervio obturador (Bergqvist A. 1992) y algunos casos de endometriosis del sistema nervioso central presentando hemorragia subaracnoidea cíclica (Duke R., Fawcett P. et al. 1995) así como crisis convulsivas coincidiendo con la menstruación (Ichida M., Gomi A. et al. 1993).

Endometriosis en el hombre.

Hay contados casos descritos de endometriosis en el hombre (Honore G. M. 1999). Se trata de hombres entre 50 y 83 años con historia de adenocarcinoma prostático, tratados con un esteroide sintético (clotrianieno) además de radioterapia y/o prostatectomía y/o orquiectomía. La endometriosis se localizaba en el aparato urinario o en pared abdominal baja. La anatomía patológica fue confirmativa de endometriosis. La clínica se caracterizó por dolor relacionado con la localización de los implantes y en ocasiones hematuria. La resección y suspender el esteroide solucionaron el cuadro. La explicación más aceptada para el origen de estos implantes, tal como discutiremos en el apartado de etiopatogenia, es el estímulo de los esteroides sobre restos embriológicos mullerianos.

Transformación maligna.

Excepcionalmente (entre el 0.3 y 0.8%) se produce una transformación maligna del tejido endometriósico (Clement P. B. 2002). Este hecho ya fue descrito por Sampson en su época (Sampson J. A. 1925). Por entonces Sampson estableció que para atribuir la neoplasia al implante endometriósico la endometriosis debía estar en íntima relación con el cáncer, la histología del cáncer debía ser compatible con un origen endometrial y ningún otro primario debía coexistir. El diagnóstico definitivo se haría por observación de la transformación progresiva del tejido benigno al maligno y no por la mera coexistencia de ambos.

Normalmente la transformación maligna se produce en la localización ovárica. La malignización de endometriosis extraovárica es muy rara, con alrededor de 60 casos descritos hasta la fecha (Hitti I. F., Glasberg S. S. et al. 1990; Jones K. D., Owen E. et al. 2002; Slomovitz B. M., Soslow R. A. et al. 2002)): la media de edad son los 48 años, la mayoría localizados en septo rectovaginal, vagina o vejiga, aunque hay casos descritos en intestino delgado, ombligo y ganglios linfáticos. Okugawa et al describen un caso de transformación maligna que atribuyen a la administración de tamoxifen (Okugawa K., Hirakawa T. et al. 2002).

El tipo histológico más frecuente es el carcinoma endometriode con el 90%. El carcinoma de células claras aparece en segundo lugar con un 14%, siendo otros tipos más excepcionales: cistoadenomas de bajo potencial maligno, tumores mucinosos, carcinomas escamosos, sarcomas estromales, tumores mesodérmicos mixtos malignos y adenosarcomas (Clement P. B. 2002).

1.1.3. Diagnóstico y estadiaje de la endometriosis

Después de una anamnesis adecuada hay que proceder a la exploración general de la paciente y a una palpación abdominal que de entrada será probablemente negativa. Procederemos a la especuloscopia, que acostumbra a resultar anodina salvo casos raros de implantes endometriósicos vaginales, y al tacto vaginoabdominal. Será especialmente interesante realizarlo en el momento de la menstruación dado que la sintomatología dolorosa se exagera. Con una cierta frecuencia tictaremos un útero en retroversión doloroso a la movilización y los ovarios pueden estar aumentados y dolorosos por la presencia de endometriomas. En un tercio de las pacientes afectas se tictarán nódulos dolorosos en los ligamentos uterosacros (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999).

Los exámenes complementarios que ayudarán al diagnóstico de endometriosis son la ecografía (Friedman H., Vogelzang R. L. et al. 1985) y la resonancia magnética (Arrive L., Hricak H. et al. 1989), que pueden describir la presencia de endometriomas ováricos. El diagnóstico diferencial será dificultoso en estos casos con los quistes hemorrágicos (Alcazar J. L., Laparte C. et al. 1997). Hay que destacar que ninguna de las dos pruebas puede diagnosticar implantes peritoneales o adherencias, por lo que aunque los exámenes complementarios resulten negativos, el diagnóstico de endometriosis debe seguir considerándose ante una clínica de sospecha (Hemmings R. 1998). El diagnóstico definitivo se hará por laparoscopia exploradora y en algunos casos con grandes masas anexiales puede indicarse una laparotomía de entrada. La determinación de CA-125 como marcador serológico, elevado en endometriosis extensas, resultaría útil en el seguimiento más que en el diagnóstico (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999). El

diagnóstico en la endometriosis extrapélvica requerirá distintos exámenes complementarios según la localización.

Diagnóstico anatomopatológico de la endometriosis

Macroscópicamente las lesiones que observaremos son muy variables y ello hace que el diagnóstico no sea siempre fácil. El aspecto más característico es el del llamado quiste de chocolate, que consiste en un endometrioma lleno de sangre, coloración marrón oscuro. Por lo demás, las lesiones pueden ser rojas, negras, azules o blancas sin pigmentación (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999). También son lesiones de endometriosis las adherencias, defectos peritoneales o implantes con aspecto de endometrio fresco, color tostado. Nisolle et al. han descrito incluso que del 6 al 13% de mujeres infértiles con peritoneo normal presentan lesiones endometriósicas cuando se biopsian, aunque se desconoce la trascendencia clínica que esto pueda tener (Nisolle M., Paindaveine B. et al. 1990). Con todo ello la conclusión que hay que sacar es que, dada la variedad cualitativa y cuantitativa de las lesiones, durante la laparoscopia hay que examinar muy cuidadosamente la pelvis y la cavidad abdominal antes de descartar totalmente el diagnóstico de endometriosis. La localización más frecuente son los ovarios, seguido de la localización extensa anterior en ligamento ancho y vejiga y la localización posterior en fondo de saco de Douglas y ligamentos úterosacros (Gruppo Italiano per lo Studio dell' Endometriosi 1994).

El aspecto microscópico de los implantes endometriósicos suele consistir en una o más glándulas recubiertas de epitelio endometrioide, rodeado por una densa capa de células pequeñas fusiformes características del estroma endometrial no neoplásico. Se acompaña de pequeños vasos a veces ingurgitados que suelen llamar la atención sobre esta lesión (Clement P. B. 2002). Las glándulas pueden ser desde simples, a microscópicamente dilatadas, hasta quistes macroscópicamente evidentes: estos quistes son más frecuentes en el ovario y excepcionales en implantes endometriósicos de otras ubicaciones. En el ovario la localización suele ser en el córtex y si los implantes son superficiales se acompañan con frecuencia de células inflamatorias y adherencias. En mujeres premenopáusicas se observan cambios cíclicos con las fluctuaciones hormonales del 44 al 80% de los casos y si se examinan varios focos de una misma paciente en el mismo momento su morfología es parecida (Bergqvist A., Ljungberg O. et al. 1984). En pacientes postmenopáusicas el aspecto de los implantes es de glándulas atróficas recubiertas por un epitelio aplanado, rodeadas por un estroma denso y fibrótico con tendencia a ser más celular cerca de las glándulas, lo cual es una pista diagnóstica (Clement P. B. 2002); en algunos casos las glándulas del implante conservan una cierta actividad. En el momento de la menstruación en mujeres premenopáusicas se puede observar hemorragia e infiltración difusa por histiocitos, que convierten los hematíes extravasados en glicolípidos, y pigmento granular marrón, constituyendo células pseudoxantomatosas que llegan a substituir prácticamente todo el estroma (Clement P. B. 2002). La cantidad de pigmento en las lesiones se relaciona con la edad de la paciente y el tiempo de evolución de los implantes (Jansen R. P. y Russell P. 1986). Si las lesiones ováricas se convierten en quistes endometriales, estos quedan recubiertos de un epitelio en monocapa cuboidal que puede tener alguna característica que recuerde al epitelio endometrial pero que con frecuencia es inespecífico: la existencia de estroma

endometrial subyacente nos orientará el diagnóstico. No es raro que este estroma sea tejido conjuntivo fibroso en el que la existencia de alguna célula pseudoxantomatosa nos dé un diagnóstico de presunción. Los quistes de larga evolución pueden presentar calcificación. En estos quistes el epitelio, focalmente, puede aparecer con atipia nuclear de significado incierto pero si esta atipia es aislada no parece tener ninguna consecuencia clínica según estudios de Seidman et al (Seidman J. D. 1996). Otros hallazgos microscópicos en los focos de endometriosis que podemos hallar son metaplasia glandular, decidualización por gestación o tratamiento con gestágenos, hiperplasia glandular, metaplasia estromal, endometriosis estromal en el ovario (sin evidencia de glándulas) y nódulos pseudoxantomatosos necróticos en mujeres menopáusicas, entre otros hallazgos más raros (Clement P. B. 2002).

Estadía de la endometriosis.

Una vez realizado el diagnóstico de endometriosis se debe intentar clasificar ésta en función de la gravedad del cuadro. La clasificación más utilizada es la revisada en 1985 por la *American Fertility Society* (American Fertility Society 1985), actual *American Society for Reproductive Medicine*, basada en el tamaño de los implantes, su localización anatómica y la existencia de adherencias, información que se habrá recogido en el momento de la laparoscopia o laparotomía. En ella se intenta establecer el pronóstico reproductivo de la paciente. Según las características y situación de los implantes y adherencias, se obtienen distintas puntuaciones que dictarán un estadio más o menos avanzado de la enfermedad. Dicha clasificación se recoge en la siguiente tabla.

Tabla 1: Estadiaje de la endometriosis

PERITONEO	ENDOMETRIOSIS		<1 cm	1-3 cm	>3 cm
	<i>Superficial</i>		1	2	4
	<i>Profunda</i>		2	4	6
OVARIO	D	<i>Superficial</i>	1	2	4
		<i>Profunda</i>	4	16	20
	I	<i>Superficial</i>	1	2	4
		<i>Profunda</i>	4	16	20
OBLITERACIÓN FONDO SACO POSTERIOR			Parcial 4	Completa 40	
OVARIO	ADHERENCIAS		<1/3 Compromiso	1/3-2/3 Compromiso	>1/3 Compromiso
	D	<i>Tenues</i>	1	2	4
		<i>Densas</i>	4	8	16
	I	<i>Tenues</i>	1	2	4
		<i>Densas</i>	4	8	16
	TROMPA UTERINA	D	<i>Tenues</i>	1	2
<i>Densas</i>			4*	8*	16
I		<i>Tenues</i>	1	2	4
		<i>Densas</i>	4*	8*	16

* Si el extremo fimbriado de la trompa uterina está completamente comprometido, cambiar la asignación de puntos a 16.

Estadio I (Mínimo): 1-5
 Estadio II (Leve): 6-15
 Estadio III (Moderado): 16-40
 Estadio IV (Profunda): >40

Esta clasificación ha sido muy discutida en tanto que para algunos autores correlaciona escasamente el estadio con la severidad del dolor. Así Koninckx et al. observaron que la correlación del dolor es sobretodo con la profundidad de las lesiones y no con el estadio de la AFS (Koninckx P. R., Meuleman C. et al. 1991). El sistema no tiene en cuenta ni la actividad celular del implante, ni la masa o la profundidad de infiltración de las lesiones, determinaciones con las cuales la correlación con el dolor sería para algunos autores como C.A. Winkel más acertada (Winkel C. A. 1999). Otros autores menos críticos con la clasificación hallan buena correlación con el estadio y la recidiva de la sintomatología después del tratamiento, como Waller et al. (Waller K. G. y Shaw R. W. 1993), así como con la historia de dolor pélvico crónico, como Stovall et al. (Stovall D. W., Bowser L. M. et al. 1997). Para C.A. Winkel la falta de correlación hallada entre la clasificación y la clínica se debe a que distintos estadios responden a diferentes enfermedades o al menos a distintas variedades de una enfermedad, con distintos orígenes, distinta clínica y distinta respuesta al tratamiento (Winkel C. A. 1999).

1.1.4. Tratamiento de la endometriosis

La evidencia de que el crecimiento de los implantes endometriósicos es hormonodependiente ha hecho que la modificación del medio hormonal sea el tratamiento habitualmente utilizado. En los últimos años han aparecido varias publicaciones intentando establecer la idoneidad de los distintos tratamientos utilizados. Así se han revisado con criterios de medicina basada en la evidencia el tratamiento médico (Moghissi K. S. 1999; Moore J., Kennedy S. et al. 2000; Prentice A., Deary A. J. et al. 2000; Prentice A., Deary A. J. et al. 2000; Selak V., Farquhar C. et al. 2000; Rice V. M. 2002), el tratamiento quirúrgico (Kim A. H. y Adamson G. D. 1999; Wilson M. L., Farquhar C. M. et al. 2000; Martin D. C. 2002), la combinación de ambos (Winkel C. A. 1999; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002) y la eficacia en estas pacientes de las técnicas de reproducción asistida (Dokras A. y Olive D. L. 1999; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002).

En el tratamiento de la endometriosis los dos objetivos evidentes son el control de la sintomatología dolorosa y la mejora de la posible infertilidad que esta enfermedad pueda acarrear. Para Olive et al. (Olive D. L. y Pritts E. A. 2002) encontrar estudios en los que se valore la mejoría del dolor es más fácil que aquellos que tratan de valorar el efecto sobre la fertilidad, en tanto que en la esterilidad pueden concurrir múltiples factores aparte de la endometriosis, el seguimiento en el tiempo debe ser más prolongado y la asociación entre endometriosis y esterilidad-infertilidad no es clara, hablándose en general de “subfertilidad”, además de existir un porcentaje de gestaciones espontáneas en pacientes con endometriosis que se debe considerar.

Tratamiento del dolor en la endometriosis

Como primera línea de tratamiento médico para el dolor asociado a la endometriosis parece evidente que se puede intentar la analgesia con antiinflamatorios no esteroideos, por el posible papel de las prostaglandinas en el cuadro doloroso y por su eficacia analgésica comprobada (Moghissi K. S. 1999); este tratamiento es insuficiente en cuadros severos o de larga evolución, en los que se acostumbra a administrar tratamiento hormonal. Los tratamientos hormonales que se utilizan pretenden inactivar los implantes. Su eficacia ha sido demostrada en diversos estudios randomizados, comparándolos con placebo o entre ellos. Así parece clara la ventaja sobre el placebo de la medroxiprogesterona (Moghissi K. S. 1999; Prentice A., Deary A. J. et al. 2000; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002), del danazol (Moghissi K. S. 1999; Selak V., Farquhar C. et al. 2000; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002), de los análogos de la hormona liberadora de las gonadotropinas, abreviado GnRH por *Gonadotrophin Releasing Hormone* en inglés (Moghissi K. S. 1999; Prentice A., Deary A. J. et al. 2000; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002) y de los anticonceptivos orales (Moghissi K. S. 1999; Moore J., Kennedy S. et al. 2000; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002). En las revisiones de estos autores ningún tratamiento parece drásticamente diferente en cuanto a eficacia, aunque sí en cuanto a efectos secundarios. Esto hace que Moore et al. propongan los anticonceptivos orales como primera línea de tratamiento por la mayor tolerancia de las pacientes a los efectos secundarios que provocan (Moore J., Kennedy S. et al. 2000). También se demuestra en varios estudios randomizados que el tratamiento “add-back” con estrógenos y progesterona al prescribir análogos de la GnRH no disminuye la eficacia de éstos, ni aún administrándolo desde el primer ciclo, mejorando notablemente la tolerancia por menor incidencia de efectos secundarios (Moghissi K. S. 1999; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002).

Respecto al tratamiento quirúrgico y su efecto sobre el dolor en la endometriosis, las revisiones de los trabajos publicados coinciden en que éste es efectivo (Kim A. H. y Adamson G. D. 1999; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002). Destaca especialmente el trabajo prospectivo, randomizado y ciego de Sutton et al., en el que se evidencia una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento quirúrgico de las lesiones asociado a ablación del nervio uterino y la laparoscopia para estadiaje solamente (Sutton C. J., Ewen S. P. et al. 1994; Sutton C. J., Pooley A. S. et al. 1997). Otros trabajos no evidencian ninguna ventaja añadiendo la ablación del nervio uterino a la resección de los implantes (Olive D. L. y Pritts E. A. 2002). En cuanto la neurectomía presaca, evaluada en trabajos con pocas pacientes y por tanto de valor limitado, parece tener cierta eficacia en la dismenorrea pero no en otros tipos de dolor (Wilson M. L., Farquhar C. M. et al. 2000). Por último la histerectomía es otra opción quirúrgica de la cual hay escasos estudios randomizados (Olive D. L. y Pritts E. A. 2002): en un estudio retrospectivo de Namnoum et al. se valora la recidiva del dolor con y sin anexectomía, siendo ésta ocho veces más elevada en el segundo caso (Namnoum A. B., Hickman T. N. et al. 1995).

El tratamiento combinado ha sido objeto de algunos estudios randomizados, habiéndose hallado beneficio al añadir después de la cirugía tratamiento médico con medroxiprogesterona, danazol y análogos (Winkel C. A. 1999; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002). La ventaja se producía no tanto reduciendo el cuadro doloroso sino al observarse menor número de recidivas. Existe un estudio randomizado de Parazzini et al. que no halla ninguna ventaja añadiendo análogos de la GnRH durante tres meses postcirugía (Parazzini F., Fedele L. et al. 1994).

Tratamiento de la fertilidad en la endometriosis.

Los mismos tratamientos médicos utilizados para tratar el dolor se han valorado para tratar la subfertilidad que acompaña a la endometriosis (gestágenos, análogos de la GnRH, etc). Un metaanálisis de los estudios publicados de Hughes et al. llega a la conclusión de que estos tratamientos no sólo no consiguen incrementar la fertilidad, si no que la empeoran si el seguimiento se considera desde el momento del diagnóstico, ya que durante el tratamiento se obtienen gestaciones en el grupo placebo que la medicación evita en el grupo tratado (Hughes E., Fedorkow D. et al. 2000).

El papel del tratamiento quirúrgico en la subfertilidad asociada a la endometriosis está universalmente aceptado en casos de corrección de la distorsión anatómica en los estadios III y IV: si bien no hay ensayos randomizados, los trabajos observacionales dejan lugar a un estrecho margen de duda respecto a la bondad del tratamiento quirúrgico en estos casos (Olive D. L. y Pritts E. A. 2002). Más controvertido es el papel de la cirugía en estadios leves-moderados: un ensayo randomizado de Marcoux et al. encontraba una clara ventaja en el grupo tratado (Marcoux S., Maheux R. et al. 1997) que no se confirmó en un estudio con menos pacientes de Parazzini et al. (Parazzini F. 1999). Olive et al., realizando un metaanálisis de ambos estudios, concluye que sí existe una cierta ventaja con el tratamiento quirúrgico aunque se necesita tratar 7.7 pacientes para obtener una gestación de más (Olive D. L. y Pritts E. A. 2002).

Un último aspecto a valorar en el tratamiento de pacientes estériles afectas de endometriosis es la respuesta de éstas a las técnicas de reproducción asistida. En varios estudios parece claro que la estimulación de la ovulación con o sin inseminación acelera la obtención de una gestación en ellas (Dokras A. y Olive D. L. 1999; Olive D. L. y Pritts E. A. 2002). Respecto a la fecundación *in vitro* no existen estudios randomizados con suficiente número de pacientes para llegar a alguna conclusión y en los retrospectivos no se demuestra mayor número de gestaciones que la simple observación, según datos de Olive et al. (Olive D. L. y Pritts E. A. 2002). En los múltiples trabajos publicados, con resultados contradictorios, tampoco se demuestra que la endometriosis afecte negativamente el resultado de la fecundación *in vitro* al compararla con otras causas de esterilidad, según Dokras et al. (Dokras A. y Olive D. L. 1999). Ambos autores exortan a que se realicen más estudios controlados, randomizados y con un número significativo de pacientes para llegar a conclusiones claras.

Tratamiento de la endometriosis extrapélvica

El tratamiento en estas pacientes no está bien establecido, seguramente por la escasa cantidad de casos, que no permite estudios randomizados. Parece oportuno individualizar el tratamiento según los órganos afectos. En estos casos el tratamiento hormonal o la histerectomía con doble anexectomía se suele asociar a la resección del implante extrapélvico para evitar recidivas, al menos en teoría. En la endometriosis ureteral el tratamiento debe ir dirigido a preservar la función renal, que en series antiguas se afectaba con mucha frecuencia por retrasos en el diagnóstico (Honore G. M. 1999). En la endometriosis del aparato digestivo se suele realizar resección de los implantes y

sólo en casos de obstrucciones severas resección del tramo de intestino afecto. En el caso de endometriosis pulmonar o pleural el tratamiento será médico en primera instancia para intentar evitar la cirugía torácica, pero en determinados casos la pleurodesis e incluso la resección segmentaria pueden hacerse necesarias (Gerlinzani S., Tos M. et al. 2002)). La endometriosis de partes blandas se soluciona con la resección de los implantes (Jubanyik K. J. y Comite F. 1997; Honore G. M. 1999).

Recidiva y perspectivas de futuro en el tratamiento de la endometriosis

A pesar del tratamiento, la endometriosis recidiva con frecuencia, con tasas que oscilan del 5 al 20 % al año y tasa acumulativa global a los 5 años del 40% (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999). El dolor recidiva a corto plazo, aunque de menor intensidad que antes del tratamiento. El tratamiento definitivo es la histerectomía con doble anexectomía, muchas veces de difícil planteamiento por la edad de la paciente o su deseo genésico. Las tasas de recidiva son parecidas con cualquier tratamiento médico y sólo mejoran un poco si se realiza exéresis quirúrgica de los implantes.

El motivo por el cual se producen estas recidivas es controvertido, aunque dado que la etiopatogenia exacta se desconoce, el tratamiento no incide probablemente en la causa (o causas) que inician la enfermedad, persistiendo los factores que favorecen su génesis.

A la luz de las alteraciones inmunes que se han hallado en el origen de la endometriosis, se están investigando tratamientos destinados a estimular la inmunidad

celular, tipo interleucinas, interferon, loxoribine o levamisole (Vignali M., Infantino M. et al. 2002). Algunos de estos fármacos, como loxoribine y levamisole, sólo han sido probados en experimentación animal con resultados esperanzadores (Keenan J. A., Williams-Boyce P. K. et al. 1999). Otros se han probado ya en ensayos clínicos: en un estudio no randomizado, de limitado valor por tanto, Ali et al. inyectaban interferon- α 2b sin resección quirúrgica de los implantes y hallaban una mejoría significativa de la sintomatología y del estadio de la enfermedad en el *second-look* laparoscópico (Ali A. F., Fateen B. et al. 2000). Sin embargo un estudio randomizado de Acien et al., utilizando también interferon- α 2b intraperitoneal después de cirugía conservadora y seguido de tratamiento con análogos de la Gn-RH, hallaba mayor tasa de recidivas en el grupo tratado con interferon (Acien P., Quereda F. et al. 2002). No se puede todavía establecer pautas válidas para la clínica diaria con fármacos inmunomoduladores. Nuevos estudios deberán proseguir esta línea de investigación.

1.2. EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS

1.2.1. Teorías etiopatogénicas sobre el origen de la endometriosis.

La endometriosis sigue siendo hoy en día una enfermedad enigmática. Cómo se origina la enfermedad es un misterio y existen varias teorías para explicar su génesis. De todas ellas, la de la implantación a partir de menstruación retrógrada es la que más aceptación tiene, aunque no se puede descartar otra teoría totalmente e incluso es posible que se llegue a desarrollar la misma enfermedad a partir de varios orígenes. Vamos a describir en primer lugar cuáles son las teorías existentes para explicar el inicio de la endometriosis y en un segundo apartado describiremos los conocimientos actuales sobre herencia, inmunidad y alteraciones moleculares que parecen contribuir al establecimiento y progresión de la enfermedad.

Teoría de la implantación

La teoría de la implantación postula que el endometrio llegaría a cavidad peritoneal por flujo retrógrado durante la menstruación, pasando desde el útero a través de las trompas, y una vez en el peritoneo se implantaría. Esta teoría fue enunciada por Sampson en 1927 (Sampson J. A. 1927) y varias observaciones han apoyado su validez:

- En experimentación animal, TeLinde et al. provocaron endometriosis en el 50% de monos en los que inducían un flujo menstrual hacia cavidad peritoneal (TeLinde R. y Scott R. 1950) y más recientemente, D'Hooghe et al. inducían endometriosis en monos inyectando flujo menstrual en retroperitoneo, progresando en el 75% de los casos (D'Hooghe T. M., Bambra C. S. et al. 1995).
- Varios autores han evidenciado menstruación retrógrada entre el 76-90% de mujeres al realizar laparoscopia durante la menstruación (Halme J., Hammond M. G. et al. 1984; Liu D. T. y Hitchcock A. 1986). El paso de células endometriales se puede producir incluso durante una histeroscopia (Egarter C., Krestan C. et al. 1996). Por lo tanto es cierto que las células endometriales pueden alcanzar de una forma u otra la cavidad peritoneal.
- Estas células llegadas a la cavidad peritoneal no sólo son viables sino que tienen capacidad para implantar. La viabilidad de las células endometriales del flujo menstrual fue demostrada en cultivos por Kettel y Stein en 1951 (Kettel W. y Stein R. 1951). Incluso se han mantenido en cultivo células endometriales y estroma recuperados de la cavidad peritoneal (Mungyer G., Willemsen W. N. et al. 1987). Ridley y Edwards demostraron que, en algunas mujeres, células endometriales del flujo menstrual se implantaban en su tejido adiposo cuando eran inyectadas en él (Ridley J. y Edwards I. 1958). Schmid inducía endometriosis implantando endometrio en cúpula vaginal de mujeres a las que histerectomizaba, para provocarles la menstruación, aduciendo razones psicológicas (Schmid H. 1961).

- La aparición de endometriosis en la episiotomía (Salamalekis E., Vasiliadis T. X. et al. 1990; Koger K. E., Shatney C. H. et al. 1993; Yackovich F. H., Bender G. N. et al. 1994) o en laparotomías por cesárea, descrito por varios autores (Kafkasli A., Franklin R. R. et al. 1996; Hughes M. L., Bartholomew D. et al. 1997; Liang C. C., Liou B. et al. 1998; Gupta R. K., Green C. et al. 2000; Nirula R. y Greaney G. C. 2000), apoya la teoría de que el endometrio, desprendido por el motivo que sea (menstruación, parto o cesárea, histeroscopia) puede implantar en otros tejidos del organismo. Incluso Kaunitz et al. han descrito una endometriosis en el trayecto de la aguja de una amniocentesis (Kaunitz A. y Di Sant'Agnese P. A. 1979).
- Es sabido que aquellas mujeres con alteraciones mullerianas y flujo menstrual dificultoso a través de la vagina presentan un riesgo incrementado de endometriosis (Sanfilippo J. S., Wakim N. G. et al. 1986; Olive D. L. y Henderson D. Y. 1987)
- La distribución de los implantes endometriósicos en la pelvis apoya esta teoría, ya que según S. Jenkins las localizaciones más frecuentes son las que reciben un flujo menstrual retrógrado más intenso (Jenkins S., Olive D. L. et al. 1986).

Otra cuestión sería explicar por qué la endometriosis se produce en unas mujeres y en otras no: si bien parece demostrado que flujo menstrual retrógrado existe hasta en el 90% de las mujeres, se calcula que sólo alrededor del 5% de éstas presentan la enfermedad; así mismo, de todos los partos y cesáreas que se realizan, son contados los casos en los que se describe endometrio implantado en las cicatrices. Las recientes

investigaciones sobre factores hereditarios, inmunidad y moléculas de adhesión van encaminadas a explicar este fenómeno. Lo desarrollaremos en el siguiente apartado.

Teoría de la metaplasia celómica y la inducción metaplásica

Según recogen Witz et al., esta teoría fue inicialmente propuesta por Iwanoff y Meyer (Witz C. A. 1999) y enuncia que la endometriosis se produce por metaplasia de las células del peritoneo. Ello está basado en que los conductos mullerianos, el epitelio germinal del ovario y el peritoneo pélvico derivan de un precursor embrionario común; se presupone por tanto que el epitelio germinal y el peritoneo tienen células capaces de diferenciarse en endometrio, o bien tienen capacidad de indiferenciarse y posteriormente diferenciarse en células endometriales.

Con esta teoría se explicaría la aparición de endometriosis en cualquier lugar de la cavidad abdominal y de la pleura, (Foster D. C., Stern J. L. et al. 1981; Elliot D. L., Barker A. F. et al. 1985; Honore G. M. 1999). También se explicaría con esta teoría la aparición de endometriosis en hombres (Honore G. M. 1999), aunque el hecho de que aparezca en hombres sometidos a terapia estrogénica parecería apoyar la teoría de que se ha iniciado por estímulo de restos mullerianos.

Como prueba de la teoría de la metaplasia celómica y en contra de la teoría de la menstruación retrógrada, Rosenfeld et al. describen la aparición de un endometrioma en una mujer con ausencia de útero por estar afecta del síndrome de Rokitansky: en esta paciente se observaron trompas normales y “restos” de los cuernos uterinos que no

fueron analizados anatomopatológicamente (Rosenfeld D. L. y Lecher B. D. 1981). Es por ello que en este caso no se puede descartar totalmente paso de células endometriales a partir de estos restos uterinos o algún resto embrionario conteniendo endometrio.

Una variante de la teoría metaplásica, que la conciliaría con la teoría de la menstruación retrógrada de Sampson, es la que enuncia que los productos de esta menstruación retrógrada son los que inducen metaplasia del peritoneo o del epitelio germinal del ovario. Experimentos de Levander et al. y Merrill et al. intentaron demostrar esto, inyectando en tejido adiposo y peritoneo de conejos no células endometriales viables, sino células desnaturalizadas no viables o productos derivados de éstas. Levander et al. obtuvieron células de aspecto endometriósico pero el resultado no fue tan claro para Merrill et al., por lo que esta teoría no se ha llegado a demostrar (Levander G. y Normann P. 1955; Merrill J. 1966).

Teoría de los restos embrionarios

Esta teoría fue enunciada por Von Recklinghausen y Russell a finales del siglo XIX (Von Recklinghausen F. 1896; Russell W. 1899). En ella postulan que restos embrionarios de origen mulleriano iniciarían la endometriosis por determinados estímulos. Recientemente Mai et al. describieron en algunos pocos casos restos embrionarios mullerianos junto a focos endometriósicos con aparentes zonas de transición entre unos y otros (Mai K. T., Yazdi H. M. et al. 1998): los propios autores reconocen que dado lo excepcional de los casos se trataría de un mecanismo poco

frecuente en el desarrollo de la endometriosis. En todo caso la teoría de los restos embrionarios podría explicar la aparición de focos de endometriosis en el varón, tal como mencionábamos antes.

Teoría de las metástasis linfáticas y vasculares

Tanto J. Halban en 1924 como Sampson en 1927 mencionaban en sus trabajos por entonces la posibilidad de diseminación hematógena y linfática (Halban J. 1924; Sampson J. 1927). La comunicación linfática entre todos los órganos de la pelvis es extensa y el hecho es que C.T. Javert describió en 1952 la presencia de células endometriales en el 6.3% de todas las linfadenectomías pélvicas, en el 29% de linfadenectomías practicadas a pacientes afectas de endometriosis y en el 6.7% de las autopsias (Javert C. 1952). La diseminación hematógena se demostró experimentalmente en conejos en 1940, produciendo endometriosis pulmonar con la inyección intravenosa de endometrio (Hobbs J. E. y Bortnick A. R. 1940). Es la teoría más aceptada para explicar endometriosis en localizaciones lejos del peritoneo, descritas en la literatura en varias ocasiones: localizaciones: en parénquima pulmonar (Bednoff S. L. y Garfinkle B. M. 1965; Granberg I. y Willems J. S. 1977; Hong Y. J., Paik H. C. et al. 1999; Koizumi T., Inagaki H. et al. 1999; Bhojawala J., Heller D. S. et al. 2000), en hueso, músculo bíceps, nervios periféricos y cerebro (Jubanyik K. J. y Comite F. 1997).

Teoría mixta: histogénesis múltiple

Fue propuesta ya por Javert en 1949 y enuncia que la endometriosis se podría originar por varios de los mecanismos postulados: implantación, diseminación linfática y diseminación hematológica (Javert C. T. 1949). Nisolle et al. proponen de forma similar que la histogénesis variaría según la localización y tipo de implante endometriósico: por implantación en peritoneo pélvico, por metaplasia en ovario y por desarrollo de restos embrionarios en tabique rectovaginal (Nisolle M. y Donnez J. 1997). Más recientemente, Vinatier et al. defienden la posibilidad de que la endometriosis se origine por menstruación retrógrada induciendo posteriormente metaplasia y desarrollo de restos mullerianos (Vinatier D., Dufour P. et al. 1999).

Esta teoría mixta es especialmente atractiva en tanto que permitiría explicar todas las localizaciones de la enfermedad y su aparición en varones. Así la endometriosis se originaría por menstruación retrógrada, que en determinados casos implantaría o bien induciría metaplasia y/o estímulo de restos embrionarios; a partir de aquí progresaría y sería capaz, como una neoplasia, de dar lugar a metástasis vía linfática y hematológica. En los varones, quedaría explicada por estímulo estrogénico sobre restos embrionarios y/o metaplasia celómica inducida por estrógenos.

1.2.2. Alteraciones fisiopatológicas en la endometriosis.

Aún asumiendo que cualquiera de las teorías anteriores fuera cierta, seguirían quedando muchas preguntas por responder. Actualmente, la teoría más aceptada es la de Sampson y la mayoría de autores asumen que un gran porcentaje de casos se origina como consecuencia de la menstruación retrógrada. De todos modos hemos dicho que la menstruación retrógrada se produce en el 90% de la población y que el endometrio menstrual es casi siempre viable cuando llega a cavidad peritoneal. ¿Por qué entonces la endometriosis se produce sólo en un 5-10% de la población? ¿Qué factores determinarían la implantación? Lo mismo es aplicable a cualquiera de las otras teorías: ¿qué inicia la metaplasia?, o bien ¿qué estimula los restos embrionarios?. ¿Por qué no todos los hombres sometidos a terapia estrogénica desarrollan endometriosis? ¿Qué determinaría que en unos casos el endometrio fuera capaz de metastatizar vía linfática o hematológica y en otros no?

En los últimos años las principales líneas de investigación han intentado responder qué alteraciones inician o mantienen el implante en las pacientes afectas de endometriosis. Estas líneas de investigación estudian:

- factores hereditarios
- alteraciones en la inmunidad afectando leucocitos y sus productos
- alteraciones en el receptor esteroideo y producción de aromatasa
- alteraciones moleculares que explicarían capacidad invasiva en las células endometriales

Los factores hereditarios

Como ya hemos anotado en epidemiología, se sospecha no sin razón que la endometriosis tiene una base genética (Simpson J. L., Elias S. et al. 1980). Se ha observado una alta incidencia de la enfermedad en familiares de primer grado de pacientes afectas (Moen M. H. y Magnus P. 1993). En un estudio con gemelas monocigotas se observó una concordancia del 90% entre ellas en cuanto a afectación por endometriosis (Oral E. y Arici A. 1997). Stefanson et al. confirmaron la agregación familiar en un estudio reciente con hermanas y primas hermanas (Stefansson H., Geirsson R. T. et al. 2002). Se está investigando qué alteración genética explicaría la aparición de endometriosis: esta alteración conllevaría alteraciones inmunes o moleculares que facilitarían la implantación. Hasta hace poco no se había demostrado una asociación con los haplotipos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, también llamado HLA por *Human Leukocyte Antigen* en inglés (Maxwell C., Kilpatrick D. C. et al. 1989), pero recientemente varios autores han hallado alteraciones en la expresión de algunos subtipos HLA del tipo I (Kitawaki J., Obayashi H. et al. 2002; Arimoto T., Katagiri T. et al. 2003) y mutaciones en el gen BRCA-1 (Goumenou A. G., Vassiliadis S. et al. 2003), que podrían explicar alteraciones moleculares afectando la respuesta inmune o la capacidad invasiva de las células. Estos hallazgos deben ser confirmados por nuevos estudios.

Alteraciones en la inmunidad afectando leucocitos y sus productos

Es particularmente atractivo pensar que los leucocitos peritoneales pueden tener un papel permitiendo que se implante el endometrio durante la menstruación retrógrada, dado que su función controlando detritus que llegan a cavidad abdominal a través de las trompas parece claro (Burns W. N. y Schenken R. S. 1999). No se ha observado diferencias en sangre periférica entre pacientes y controles en cuanto a concentración de leucocitos en general ni en sus subpoblaciones, pero sí se ha encontrado diferencias en las concentraciones de leucocitos en líquido peritoneal. Así Olive et al. hallaron mayor concentración de células en líquido peritoneal de pacientes infértiles en general pero especialmente si eran infértiles afectas de endometriosis (Olive D. L., Weinberg J. B. et al. 1985). Hill et al. encontraron mayor concentración de leucocitos en líquido peritoneal en endometriosis estadio I y II y pacientes infértiles sin endometriosis que en pacientes fértiles sin endometriosis; esta diferencia no se observó en los estadios III y IV (Hill J. A., Faris H. M. et al. 1988). Resultados similares obtuvieron Haney et al. (Haney A. F., Jenkins S. et al. 1991). El aumento en el recuento celular leucocitario de líquido peritoneal afecta sobretodo a macrófagos, aunque también a células T helper y células Natural Killer (Haney A. F., Jenkins S. et al. 1991).

Los mecanismos que inducen este aumento en la concentración de macrófagos en el líquido peritoneal es desconocido, aunque McLaren et al. han descrito una mayor resistencia a la apoptosis de los macrófagos en mujeres con endometriosis, por mayor expresión de la molécula Bcl-2, y por tanto una capacidad de persistencia mayor (McLaren J., Prentice A. et al. 1997). También Weil et al. han descrito una mayor capacidad quimiotáctica de los macrófagos en mujeres con endometriosis estadio I y II

(Weil S. J., Wang S. et al. 1997). En la misma línea Sharpe-Timms et al. detectaron un incremento en tejido endometriósico de factor estimulador de las colonias de granulocito-macrofagos comparado con el endometrio normal (Sharpe-Timms K. L., Bruno P. L. et al. 1994). Según investigaciones de Arici et al., los propios productos de los macrófagos como interleucina 1(IL-1) y *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) , que como veremos después están aumentados en la endometriosis, inducen en células endometriales cultivadas producción de proteína quimiotáctica para los monocitos (Arici A., Oral E. et al. 1997).

Este aumento en la concentración de macrófagos en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis podría contribuir a la patogénesis de la endometriosis mediante la producción de factores de crecimiento y citocinas. Halme et al. demostraron aumento en la secreción de factor de crecimiento derivado de los macrófagos en mujeres con endometriosis (Halme J., White C. et al. 1988); varios autores han demostrado incrementos en la concentración en líquido peritoneal de IL-1 y TNF α , ambos producidos mayoritariamente por macrófagos, en mujeres afectas de endometriosis (Halme J., White C. et al. 1988; Overton C., Fernandez-Shaw S. et al. 1996; Rana N., Braun D. P. et al. 1996; Harada T., Yoshioka H. et al. 1997): tanto IL-1 como TNF- α son proinflamatorias e inducen a su vez producción de más IL-1 y de interleucina-6 (IL-6) por parte de los propios macrófagos. La IL-1 in-vitro inhibe la proliferación endometrial pero el TNF- α en combinación con el FGF (por *Fibroblast Growth Factor*, o Factor de Crecimiento de los Fibroblastos) induce in-vitro proliferación del estroma endometrial (Hammond M. G., Oh S. T. et al. 1993). El TNF- α incrementa además la adherencia del estroma endometrial a la matriz extracelular, según investigaciones de

Witz et al. (Witz C. A. y Schenken R. S. 1997), pudiendo influir en los primeros estadios de la enfermedad. También se han detectado incrementos de otros productos de los macrófagos como IL-6, que activa varias células del sistema inmunitario aunque in-vitro tiene efecto inhibitor sobre la proliferación del estroma endometrial, y la interleucina-8 (IL-8), con capacidad quimiotáctica para los neutrófilos y potente factor angiogénico, además de inducir proliferación en cultivos de tejido endometriósico y de endometrio (Hammond M. G., Oh S. T. et al. 1993; Rana N., Braun D. P. et al. 1996; Harada T., Yoshioka H. et al. 1997; Overton C. E., Fernandez-Shaw S. et al. 1997; Witz C. A. y Schenken R. S. 1997).

Otro factor que Oosterlynck et al. han hallado incrementado en líquido peritoneal y cuya fuente principal son los macrófagos es el VEGF (por *Vascular Endothelial Growth Factor* o Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular), potente factor angiogénico que en teoría garantizaría la vascularización del implante endometriósico cuando éste alcanza determinado volumen (Oosterlynck D. J., Meuleman C. et al. 1994). Según McLaren et al. esta producción de VEGF por parte de los macrófagos se estimula con estrógenos y progesterona (McLaren J., Prentice A. et al. 1996).

Si bien como decíamos al principio de este apartado no se han hallado diferencias numéricas en la concentración de leucocitos y sus subpoblaciones en sangre periférica, algunos autores sí han hallado diferencias funcionales en monocito-macrófagos. Braun et al. describieron un incremento en la producción basal y estimulada por TNF- α , IL-6 e IL-8 en monocitos de sangre periférica de mujeres afectas de endometriosis, sugiriendo que el problema no residiría solamente en los macrófagos de líquido peritoneal (Braun D. P. y Dmowski W. P. 1998).

En la línea de alteraciones de los leucocitos peritoneales, también los linfocitos T y sus productos se han implicado en la patogénesis de la endometriosis. Ya explicábamos antes que el incremento en la concentración de leucocitos en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis se debía a incremento de macrófagos, pero también a incremento en la concentración de linfocitos T. Hsu et al. observaron una mayor concentración de interleucina-4 (IL-4) en líquido peritoneal y sangre periférica, producida por linfocitos T activados en forma de T-Helper tipo 2 (Th2) y cuya función es inhibir la inmunidad celular. La interleucina 10 (IL-10), producida también por linfocitos Th2 y con la misma función, se hallaba incrementada sólo en líquido peritoneal; los productos de los linfocitos T helper tipo 1 (Th1), IL-2 (Interleucina-2) y γ -Interferon (γ -IF), que activan la inmunidad celular, se hallaban disminuídos en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis (Hsu C. C., Yang B. C. et al. 1997). Estos resultados se han visto apoyados por investigaciones de otros grupos (Ho H. N., Wu M. Y. et al. 1997) mientras que algunos autores no han encontrado diferencias en la concentración o producción de IL-10 (Rana N., Braun D. P. et al. 1996; McLaren J., Dealtry G. et al. 1997).

Otros productos secretados tanto por linfocitos T como por macrófagos se hallan incrementados en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, como el TGF- β (por *Tumor Growth Factor*- β en inglés, o Factor de Crecimiento Tumoral β), con efecto estimulador de la mitosis en determinados tipos celulares e inhibidor de la inmunidad celular (Oosterlynck D. J., Meuleman C. et al. 1994). Por si sólo, in vitro, el TGF- β

estimula la proliferación del estroma endometrial (Hammond M. G., Oh S. T. et al. 1993).

Por otro lado, la interleucina-13 (IL-13), producida por los Th2, se ha hallado disminuida en pacientes con endometriosis: su función sería la de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, estando por tanto esta capacidad disminuída y las citocinas proinflamatorias aumentadas en la endometriosis (McLaren J., Dealtry G. et al. 1997).

Otro producto de los linfocitos T, aunque en este caso no activados, es la proteína RANTES, de bajo peso molecular, y que Khorraman et al han hallado elevada en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis: su función es la de reclutar y activar macrófagos y sus niveles concuerdan con el estadio de la endometriosis (Khorram O., Taylor R. N. et al. 1993).

Esta mayor concentración de macrófagos y linfocitos T activados así como el incremento en la producción de citocinas no sólo se ha observado en líquido peritoneal sino también en el propio implante endometriósico cuando se compara con el endometrio eutópico (Klein N. A., Pergola G. M. et al. 1993; Witz C. A., Montoya I. A. et al. 1994; McLaren J., Dealtry G. et al. 1997). Estas diferencias no se observan al comparar endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y endometrio de pacientes sin endometriosis (Jones R. K., Bulmer J. N. et al. 1998).

En resumen, en líquido peritoneal de mujeres afectas de endometriosis y en el propio implante endometriósico parece existir una mayor concentración de macrófagos

y linfocitos T que secretarían citocinas y factores de crecimiento, que a su vez favorecerían el desarrollo del implante endometriósico. En esta línea, Surrey et al. demostraron aumento de la proliferación en cultivos de células endometriales al añadir líquido peritoneal de mujeres afectas de endometriosis (Surrey E. S. y Halme J. 1990); esto no pudo ser confirmado por Overton et al. en un experimento similar aunque los medios de cultivo utilizados eran distintos (Overton C. E., Fernandez-Shaw S. et al. 1997). En todo caso no queda claro si estos fenómenos son causa o consecuencia de la endometriosis: es posible que el mecanismo por el que se produce el implante sea otro y, una vez el implante iniciado, se activen estos mecanismos inmunológicos que favorezcan la persistencia y el crecimiento de los focos endometriósicos. Las alteraciones inmunes podrían ser consecuencia del inicio de la endometriosis y no su causa directa.

Las células *Natural Killer* (NK), que forman también parte del incremento de leucocitos peritoneales, se han implicado también en el origen de la endometriosis. Son linfocitos grandes granulados que forman parte de la inmunidad llamada natural o primaria. No requieren sensibilización previa y su función principal es la de lisar ciertas células tumorales y células infectadas por virus. Su función puede realizarse directamente o bien activando secundariamente linfocitos T. Su actividad a su vez se estimula por productos de los macrófagos y de los linfocitos T (Jameway C. A., Travers P. et al. 2003). Una de las funciones más interesantes de las células NK es que son capaces de lisar células autólogas desplazadas de su situación normal (Dmowski W. P., Gebel H. M. et al. 1994). Así los linfocitos NK podrían ser los responsables de lisar cada mes el endometrio que llega a peritoneo mediante la menstruación retrógrada. Si su función falla, este endometrio, que como hemos dicho anteriormente tiene demostrada

su capacidad de implantación, iniciaría la endometriosis. Dado que esta tesis se basa en alteraciones de las células NK, queremos ampliar en un apartado distinto las investigaciones que hasta la fecha se han realizado en este campo (ver *Las alteraciones en las células Natural Killer y el origen de la endometriosis*).

Alteraciones en el receptor esteroideo y producción de aromatasa

Desde hace mucho tiempo es sabido que el desarrollo de la endometriosis es hormonodependiente: la enfermedad aparece durante la edad fértil, progresa mientras existe estímulo hormonal, mejora al inhibir el ciclo menstrual y regresa con la menopausia. Los implantes tienen receptores de estrógenos y progesterona que además no siguen los mismos cambios cíclicos que en el endometrio eutópico (Bergqvist A., Ljungberg O. et al. 1993; Nisolle M., Casanas-Roux F. et al. 1997). Noble et al. han descrito así mismo expresión de aromatasa en tejido endometriósico por lo que el propio implante produciría estrógenos, manteniendo el crecimiento (Noble L. S., Simpson E. R. et al. 1996). Además los propios macrófagos expresan receptores de estrógenos que estimulan la producción de citocinas, entre ellas la IL-6, que a su vez es capaz de estimular la expresión de aromatasa en otros tejidos (Noble L. S., Simpson E. R. et al. 1996). Como en las alteraciones linfocitarias y de los macrófagos ya descritas, estos mecanismos pueden ser más la causa de la perpetuación y crecimiento del implante que su origen. Más interesante sería el incremento de aromatasa descrito en endometrio eutópico de mujeres afectas de endometriosis descrito por Kitawaki et al., que según los autores identifica mujeres afectas de endometriosis, miomas y adenomiosis con una

sensibilidad y especificidad de más del 90% (Kitawaki J., Kusuki I. et al. 1999; Kitawaki J., Kado N. et al. 2002) Está todavía por dilucidar el papel que tendría esta sobreexpresión de la aromatasa en endometrio eutópico de mujeres afectas de endometriosis.

La capacidad invasiva y de adhesión del endometrio.

Otras de las líneas de investigación existentes es el estudio de la capacidad invasiva del endometrio que llega a cavidad peritoneal. En este sentido se ha experimentado con animales buscando qué condiciones favorecerían la implantación y qué mecanismos moleculares la permitirían. Van der Linden et al. observaron en un experimento con fragmentos endometriales y membrana amniótica que sólo si ésta presentaba alguna interrupción el endometrio era capaz de implantar, concluyendo que la endometriosis se produciría sobre mínimas lesiones previas del peritoneo (Van der Linden P. J., de Goeij A. F. et al. 1996). Sin embargo Witz et al., en un experimento con peritoneo, observaron implantación del endometrio en la superficie epitelial siempre dependiente del estroma endometrial, llegando a la conclusión que el estroma era capaz de adherirse a la superficie del peritoneo y desde allí invadirlo (Witz C. A., Monotoya-Rodríguez I. A. et al. 1999).

En esta línea también se ha descrito incremento de expresión de la colagenasa intersticial en lesiones activas, así como se han implicado las metaloproteinasas matriciales en el origen del implante (Kokorine I., Nisolle M. et al. 1997). En un

experimento de Salomonsen et al. con ratones, el endometrio era capaz de implantar cuando se incrementaban los niveles de metaloproteinasas al tratarlos con estrógenos y no lo eran cuando disminuían al tratarlos con progesterona (Salomonsen L. A., Butt A. R. et al. 1997). Ueda et al. hallaron aumento de RNA mensajero de determinadas metaloproteinasas en implante endometriósico respecto a endometrio normal (Ueda M., Yamashita Y. et al. 2002).

Por otro lado también se está investigando si moléculas de adhesión homotípica están modificadas en la endometriosis, explicando que el endometrio se adhiera con más facilidad a peritoneo: así se ha hallado expresión alterada de algunos tipos de cadherina en células endometriales, alteraciones muy parecidas a las que presentan las células neoplásicas y que explicarían la capacidad invasiva de la endometriosis (Zeitvogel A., Baumann R. et al. 2001)

1.2.3. Las alteraciones en las células Natural Killer y el origen de la endometriosis.

Tal y como hemos introducido en el apartado anterior, las alteraciones en las funciones de las poblaciones de leucocitos peritoneales son muy atractivas para explicar por qué el endometrio de la menstruación retrógrada implanta en las pacientes afectas y no implanta en mujeres sanas, dado que la función de estos leucocitos controlando los detritus que llegan a través de las trompas parece evidente (Burns W. N. y Schenken R. S. 1999). Dentro de las subpoblaciones leucocitarias, las células Natural Killer (NK) resultan especialmente interesantes por las funciones que son capaces de realizar. Varios autores han estudiado la función de estas células en mujeres afectas de endometriosis y han hallado diversas alteraciones.

Función y mecanismo de acción de las células Natural Killer

Las células NK derivan de un precursor común con los linfocitos T cuando este precursor se estimula con interleucina-15 (IL-15), (Mingari M. C., Vitale C. et al. 1997). Son linfocitos grandes granulados que forman parte de la inmunidad llamada natural o primaria. No requieren sensibilización previa y su función principal es la de lisar células tumorales y células infectadas por virus, directamente o bien activando linfocitos T. Son el primer paso en la inmunidad celular y la calidad de su respuesta puede condicionar la respuesta inmune celular subsiguiente (Moretta L., Bottino C. et al. 2002). Expresan las

moléculas de superficie CD16 y CD56 pero no CD3 (CD por *cluster of differentiation*) ni los receptores de los linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ (O'Shea J. y Ortaldo R. 1992); no requieren presentación del antígeno junto a las proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, como los linfocitos T, para iniciar la función citolítica. Su actividad se incrementa secundariamente por productos de los macrófagos y de los linfocitos T, como IL 1, IL 2, IL 12, IFN γ y TNF α (Jameway C. A., Travers P. et al. 2003). Una función peculiar e interesante de las células NK es su capacidad para lisar células autólogas desplazadas de su situación normal (Dmowski W. P., Gebel H. M. et al. 1994), como podría ser el endometrio fuera de la cavidad endometrial.

Hasta no hace muchos años las células NK eran un misterio en tanto que, dado que no requerían sensibilización previa, su capacidad citolítica podría en teoría lisar las células del propio organismo. El mecanismo por el cual esto no ocurría se intuía a principios de los años 90, cuando Ljunggren y Karre enunciaron la hipótesis de que las propias moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I, también llamadas antígenos leucocitarios humanos tipo I y abreviado HLA I (por *Human Leukocyte Antigen I* en inglés), serían reconocidas por las células NK dando lugar a una señal inhibitoria de la actividad destructora (Ljunggren H. G. y Karre K. 1990). Efectivamente en los últimos años se han identificado los receptores que se unen a las moléculas HLA I, induciendo una inhibición de las funciones de la célula NK: las células NK lisan las células que han perdido la expresión de HLA I o bien que lo expresan en cantidad insuficiente (Moretta L., Bottino C. et al. 2002).

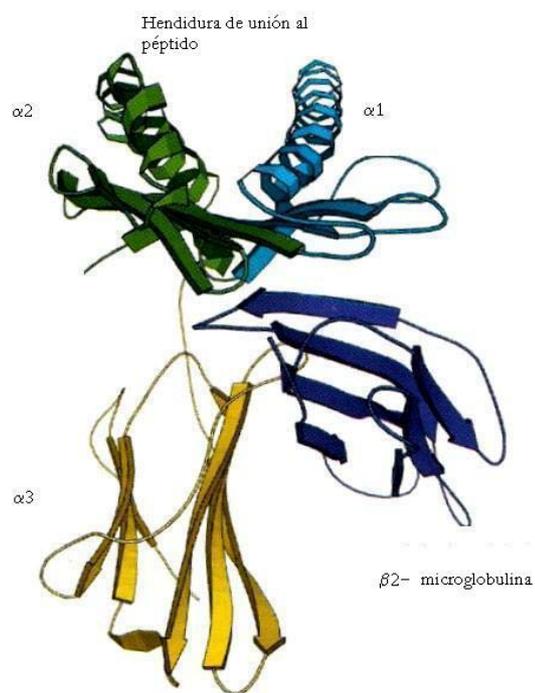
Las moléculas HLA I tienen como función unirse a péptidos de origen vírico sintetizados en citoplasma y presentarlos en la superficie celular para que sean

reconocidos por los linfocitos T citotóxicos, produciéndose la lisis de la célula infectada. Otra función descubierta prácticamente en la última década es la de mantener inhibidas las células NK. Las moléculas HLA tipo I son poligénicas, es decir que cada individuo posee varios genes que producen distintas moléculas, y polimórficas, es decir, que en la población existen múltiples variantes de cada gen. Todo ello hace que su capacidad para unirse a agentes patógenos sea amplia. Se expresan en casi todas las células nucleadas del organismo aunque con distinta intensidad. Su expresión en las células se regula por citocinas, en especial interferones. Se componen de dos cadenas peptídicas: la cadena α , que atraviesa la membrana, y una cadena más pequeña, la β_2 microglobulina. La cadena α tiene tres dominios, de los cuales α_1 y α_2 son polimórficos y son los que confieren diversidad a la molécula, y α_3 , que es monomórfica. La cadena β_2 microglobulina es monomórfica. Las subunidades α_1 y α_2 se codifican en el cromosoma 6, la subunidad α_3 monomórfica en el cromosoma 5 y la β_2 microglobulina en el cromosoma 15 (Jameway C. A., Travers P. et al. 2003).

Las moléculas HLA I realizan la función de inhibir las células NK a través de unos receptores, llamados KIR por *Killer Ig-like Receptors*. Estos receptores pueden reconocer determinantes alélicos compartidos por todas las moléculas HLA I, pueden reconocer una molécula HLA I específica o bien un alelo de un subgrupo determinado del HLA I, como el *Human Leukocyte Antigen Ib* (HLA Ib) y el *Human Leukocyte Antigen E* (HLA-E). Cada receptor inhibidor lo expresa un subgrupo de células NK y en condiciones normales las células NK maduras expresan un solo receptor inhibidor. Las células NK de un individuo se mantendrían inhibidas por el repertorio de moléculas HLA I propias de aquel individuo. La pérdida de expresión de cualquier molécula HLA

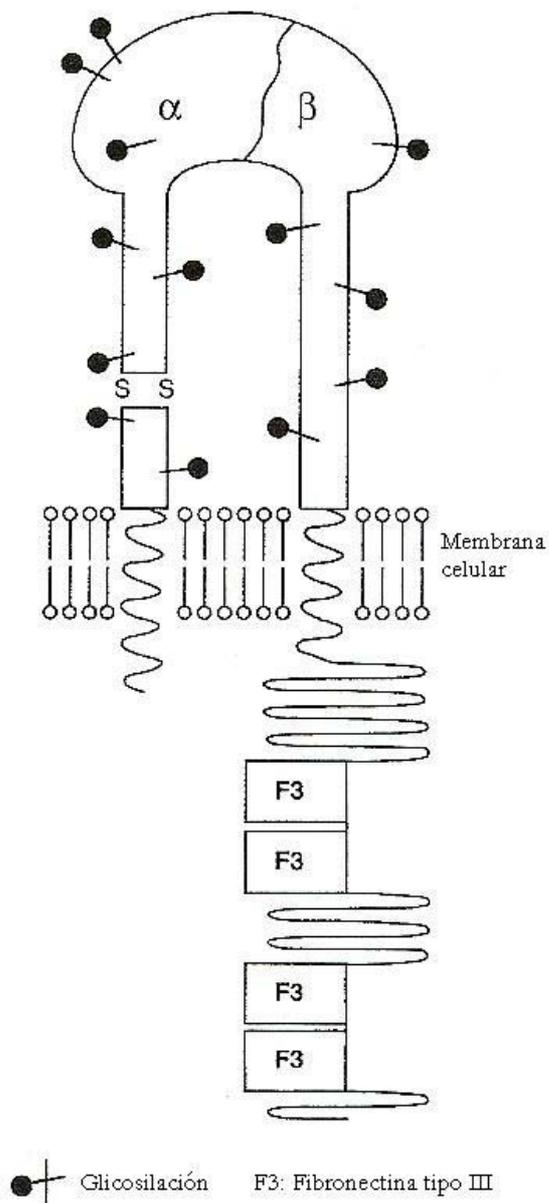
I por parte de una célula o su modificación será detectada por el subgrupo de células NK correspondiente que la destruirán (Lanier L. L. 1998).

Figura 1: Representación tridimensional de la estructura de HLA I



Además de los receptores inhibidores, las células NK tienen numerosos receptores activadores de su función citolítica, incluyendo las lectinas tipo C de unión al calcio que reconocen una amplia variedad de terminales carbohidratados expresados en numerosas células (Jameway C. A., Travers P. et al. 2003). Estas lectinas podrían ser las responsables de la unión a la integrina $\alpha 6\beta 4$, cuyo bloqueo con anticuerpos monoclonales inhibe la citolisis de las células NK sobre el epitelio (Phillips J. H., McKinney L. et al. 1991). La integrina $\alpha 6\beta 4$ es una molécula de adhesión que pertenece a la familia de las integrinas, cuya función principal, aunque no la única, es la de unir el citoesqueleto a la matriz extracelular y transmitir señales autocrinas del medio extracelular al interior de la célula. Están implicadas no sólo en la adhesión, sino también en la motilidad celular, proliferación, apoptosis, inducción de transcripción de genes y diferenciación. Las integrinas se componen de dos cadenas peptídicas, α y β , ambas transmembrana y N-glicosiladas. La subunidad $\alpha 6$ se compone de 1073 aminoácidos y tiene dos isoformas posibles; el gen que la codifica se halla en el cromosoma 2. La subunidad $\beta 4$ tiene 1875 aminoácidos y tres isoformas; el gen que la codifica se halla en el cromosoma 17.

Figura 2: Representación gráfica de la integrina $\alpha 6 \beta 4$



Dentro de los receptores activadores de las células NK existen unos cuya expresión es propia y característica de estas células y que son denominados Receptores Naturales de Citotoxicidad (NCR por *Natural Cytotoxicity Receptors* en inglés). Su función es muy importante en la lisis de células tumorales. Se identifican como NKp46 y NKp30, expresados en células NK activas y en reposo, y NKp44, expresado por células NK activadas. Los ligandos para estos NCR en las células no se han identificado pero se cree que son moléculas expresadas por células transformadas por cambios en la temperatura, infecciones virales o transformación tumoral (Moretta L., Bottino C. et al. 2002).

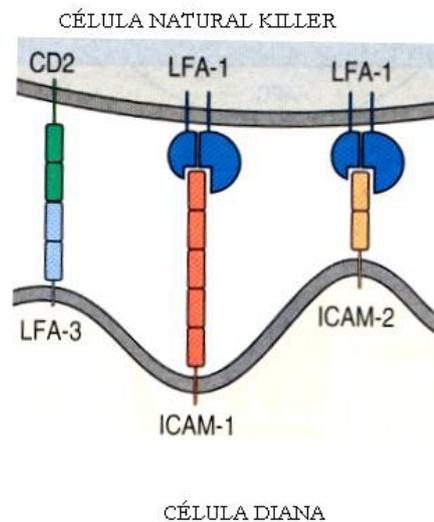
Existen receptores activadores de las células NK que no son específicos de estas células y los presentan también los linfocitos T citotóxicos. Uno de ellos es el NKG2D, cuyos ligandos sí están identificados: son la proteína MICA/b y la proteína ULBP, expresadas predominantemente en células epiteliales sometidas a estrés (Bauer S., Groh V. et al. 1999).

Otro receptor activador que las células NK comparten con los linfocitos T es la molécula de adhesión LFA-1 (LFA por *Leukocyte Function Associated*), que pertenece a la familia de las integrinas, formando un dímero de cadenas polipeptídicas α_L y β_2 . Sus ligandos en las células diana son otras tres moléculas de adhesión: la *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), la *Intercellular Adhesion Molecule 2* (ICAM-2) y la *Intercellular Adhesion Molecule 3* (ICAM-3). Las tres pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se componen de cadenas de 532, 275 y 547 aminoácidos respectivamente. ICAM-1 se expresa en muchos tipos celulares, incluyendo epitelios, mientras que ICAM-2 se

expresa en células de estirpe hematopoyética, células estromales y endoteliales e ICAM-3 en leucocitos y células de Langerhans.

Las células NK comparten todavía otro receptor activador con los linfocitos T, la molécula de adhesión CD2, de la superfamilia de las inmunoglobulinas y compuesta por una cadena peptídica de 351 aminoácidos. Su ligando en la célula diana es otra molécula de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas, la *Leukocyte Function Associated* -3, abreviado LFA-3, compuesta por una cadena de 250 aminoácidos y codificada en el cromosoma 1. La unión de estas dos moléculas contribuye a la adhesión de la célula NK con su diana y a activar la respuesta citolítica (Pigott R. y Power C. 1993; Jameway C. A., Travers P. et al. 2003).

Figura 3: Representación esquemática de la interacción ICAM-1/LFA-1, ICAM-2/LFA-1 y LFA-3/CD2



Expresan también un receptor para la inmunoglobulina IG G, permitiendo la lisis de células unidas a anticuerpos (Jameway C. A., Travers P. et al. 2003).

La complejidad de la respuesta citolítica NK se demuestra con el reciente descubrimiento de dos receptores más, identificados como 2B4 y NTB4, que pueden actuar estimulando o inhibiendo la función de la célula según su porción intracitoplasmática esté unida o no a la proteína SAP (SAP por *SLAM-associated protein*, SLAM por *Small Lymphocyte Associated Molecule*): en ausencia de SAP transmiten una señal inhibitoria, en su presencia activadora (Moretta L., Bottino C. et al. 2002).

Las células NK y su papel en la endometriosis

Conceptualmente se hace difícil pensar que el sistema inmune pueda lisar células normales del propio individuo, en tanto que parece preparado para discernir entre las propias células y las extrañas (considerando también extrañas las células alteradas por afectación viral o transformación tumoral). Sin embargo las células NK son capaces de destruir blastos T circulantes aunque sean fenotípicamente normales (Hoglund P., Ohlen C. et al. 1991). También se observó en un experimento con perros que los testes del propio animal autotransplantados a otra localización sufrían infiltración linfocitaria y destrucción (Dmowski W. P., Gebel H. M. et al. 1994). El sistema inmune sería capaz de reconocer células propias pero fuera de su localización normal: en el caso de la

endometriosis, enfermedad en la que implanta endometrio fuera de su localización fisiológica, se hacía obligado estudiar esta función del sistema inmune consistente en mantener cada tipo celular en su ubicación.

En 1981 Dmowski et al. demostraron un déficit de la inmunidad celular respecto a células endometriales propias en monas que desarrollaban endometriosis; por otro lado, monos sometidos a irradiación o inmunotoxinas presentaban mayor incidencia de endometriosis y mayor severidad de ésta (Dmowski W. P., Steele R. W. et al. 1981). Estudios similares en mujeres indicaban una tendencia parecida sin obtener diferencias estadísticamente significativas (Steele R. W., Dmowski W. P. et al. 1984): estos trabajos iniciaban una línea de investigación basada en el papel de la inmunidad en permitir la implatación del endometrio.

Inspirándose en éstos trabajos anteriores, Oosterlynck et al. (Oosterlynck D. J., Cornillie F. J. et al. 1991) en 1991 realizaron un ensayo comparando mujeres con endometriosis y mujeres sin endometriosis que consultaban por infertilidad o algias. Enfrentaron linfocitos de sangre periférica a células endometriales y a una diana clásica de las células NK, las K562. En su trabajo observaron que la actividad NK estaba disminuída en mujeres afectas de endometriosis comparando con mujeres no afectas, más cuanto más severa era la enfermedad (lisaban con más dificultad las células K562). La dificultad en la lisis se producía igualmente al enfrentar los linfocitos a células endometriales y la disminución correlacionaba igualmente con el estadio de la enfermedad. Ello no dependía de alteraciones cuantitativas en el recuento de linfocitos y sus subtipos dado que no existían diferencias entre mujeres afectas y no afectas. Al enfrentar linfocitos heterólogos, obtenidos de varón, a las células endometriales de

mujeres afectas de endometriosis, éstos mostraban igualmente dificultad en lisarlas en casos de endometriosis estadio II, III y IV, sugiriendo una especial resistencia a la lisis por parte del endometrio en estas pacientes. En mujeres no afectas de endometriosis observaron una lisis mayor de células endometriales por parte de los linfocitos citotóxicos autólogos y heterólogos. Esta lisis dependía fundamentalmente de las células NK, dado que al depleccionar con anticuerpos monoclonales la muestra de células NK, la lisis era casi inexistente (Oosterlynck D. J., Cornillie F. J. et al. 1991).

Vigano et al. publicaron en el mismo año un trabajo en idéntico sentido, con algunas diferencias. Observaron igualmente una disminución de la citotoxicidad al enfrentar linfocitos de sangre periférica a endometrio en mujeres afectas de endometriosis, comparando con mujeres no afectas; ello correlacionaba también con el estadio de la enfermedad. En su caso evaluaron por separado la citotoxicidad frente al componente estromal y epitelial, observando que esta disminución era significativa frente al componente estromal pero no frente al componente epitelial. A diferencia de Oosterlynck et al, no hallaron diferencias entre mujeres afectas y no afectas en la lisis de células K562, concluyendo que no hay diferencias funcionales en las células NK de ambos grupos. Atribuyeron a características del endometrio de mujeres afectas de endometriosis la capacidad de resistencia a la lisis por parte de células citotóxicas y sugirieron alteraciones en las moléculas implicadas en la adhesión intercelular para explicar el trastorno.

El déficit funcional de las células NK de sangre periférica para lisar su diana específica K562 ha sido observada por otros autores posteriormente al trabajo de Oosterlynck (Garzetti G. G., Ciavattini A. et al. 1993; Iwasaki K., Makino T. et al. 1993;

Wilson T. J., Hertzog P. J. et al. 1994). Di Stefano et al. y Garzetti et al. han relacionado el déficit funcional de las células NK de sangre periférica con altos niveles de estrógenos en pacientes con endometriosis (Garzetti G. G., Ciavattini A. et al. 1993; Di Stefano G., Provinciali M. et al. 1994). Otros autores no han podido confirmar este defecto en sangre periférica (D'Hooghe T. M., Scheerlinck J. P. et al. 1995). Jamás se han encontrado diferencias cuantitativas en el recuento hematológico de células NK (Oosterlynck D. J., Cornillie F. J. et al. 1991; Iwasaki K., Makino T. et al. 1993; Oosterlynck D. J., Meuleman C. et al. 1994). Si este déficit funcional en sangre periférica fuera real, las pacientes afectas de endometriosis deberían presentar alta susceptibilidad a las infecciones víricas y alta incidencia de determinadas neoplasias, hecho que no se ha demostrado.

En otro trabajo, Oosterlynck et al. hallaron que la actividad NK se inhibía por el líquido peritoneal de mujeres afectas de endometriosis (Oosterlynck D. J., Meuleman C. et al. 1993). Hirata et al. observaron que la actividad NK en mujeres con endometriosis se normalizaba con la extirpación de los focos de endometriosis, atribuyendo a éstos la producción de factores inmunosupresivos. En una más reciente publicación, Wu et al. observaron también una disminución de la citotoxicidad NK en líquido peritoneal de mujeres afectas de endometriosis, así como una mayor expresión de receptores inhibidores en estas células NK de estas pacientes, mayor cuanto más avanzado el estadio, y atribuyeron el déficit funcional a este fenómeno (Wu M., Yang J. et al. 2000). Maeda et al. han confirmado en trabajos posteriores una mayor expresión de los receptores inhibidores en células NK de mujeres afectas de endometriosis (Maeda N., Izumiya C. et al. 2002). El hecho es que como en el caso de las alteraciones observadas en los macrófagos y los linfocitos T, la afectación de las funciones de las células NK en

líquido peritoneal y tejido endometriósico sugieren más un papel en la progresión de la enfermedad que no en el inicio de ésta.

La alteración funcional de las células NK junto a las otras alteraciones inmunes descritas en apartados anteriores ha llevado a plantear que el tratamiento de la endometriosis debe intentar corregir estos déficits inmunes para ser realmente efectivo. En este sentido, teniendo en cuenta que los estrógenos podrían inhibir la función de las células NK (Albrecht A. E., Hartmann B. W. et al. 1996; Ben-Eliyahu S., Shakhar G. et al. 2000) y que en la endometriosis el nivel de estrógenos y el estadio correlacionan inversamente con la función de las células NK (Di Stefano G., Provinciali M. et al. 1994; Garzetti G. G., Ciavattini A. et al. 1995), varios autores han estudiado el efecto de la negativización de los niveles estrogénicos mediante análogos de la Gn-RH sobre las células NK, hallando una modulación positiva sobre su función (Garzetti G. G., Ciavattini A. et al. 1996; Hsu C. C., Lin Y. S. et al. 1997; Umesaki N., Tanaka T. et al. 1999). Umesaki et al. atribuyen el efecto inmunomodulador de los análogos a otros factores a parte de la hipoestrogenemia, dado que no encuentran una correlación significativa entre el descenso de los niveles de estrógenos y el incremento de la función NK (Umesaki N., Tanaka T. et al. 1999).

Se ha propuesto tratamientos inmunomoduladores directos para corregir estas alteraciones funcionales de las células NK: Ya hemos mencionado en el capítulo de tratamiento el estudio de Ali et al., no randomizado, con 25 pacientes, en el que inyectaron mediante laparoscopia interferon- α 2b en las lesiones endometriósicas, un estimulador de la función de las células NK y otras células inmunitarias: observaron mejoría de la clínica, incremento de la tasa de embarazos y disminución del estadio de la

enfermedad en el *second-look* laparoscópico (Ali A. F., Fateen B. et al. 2000). Estos resultados se contradicen con los de Acien et al. en los que observan mayor tasa de recidivas en el grupo de tratamiento con interferon- α 2b, en un estudio randomizado (Acien P., Quereda F. et al. 2002). Otros inmunomoduladores como loxoribine y levamisole, también estimuladores de la función de las células NK, han sido evaluados por Keenan et al. en ratones en los que se había inducido endometriosis con aparente buen resultado (Keenan J. A., Williams-Boyce P. K. et al. 1999).

El papel de los ligandos para las células Natural Killer en el origen de la endometriosis.

De los primeros trabajos sobre la dificultad de las células NK para lisar las células endometriales en pacientes afectas de endometriosis, especialmente sugestivas eran las observaciones de que existe una especial resistencia del endometrio de estas pacientes a la lisis por NK. Ello explicaría el primer paso para que este endometrio implantara en la pelvis. En el trabajo de Oosterlynck et al. los NK heterólogos presentaban una dificultad similar a los autólogos para lisar el endometrio de mujeres con endometriosis y ésta era mayor cuanto más avanzado el estadio (Oosterlynck D. J., Cornillie F. J. et al. 1991). Vigano et al. atribuyeron el déficit de lisis a alguna característica especial del endometrio sugiriendo afectación de las moléculas de adhesión (Vigano P., Vercellini P. et al. 1991).

Varias líneas de trabajo se iniciaron por entonces para identificar qué factores hacían a este endometrio resistente a la lisis por linfocitos NK. Un factor del propio

endometrio que podría explicarlo sería una producción excesiva de estrógenos por actividad aromatasas in situ, observado por Kitawaki et al. (Kitawaki J., Kusuki I. et al. 1999; Kitawaki J., Kado N. et al. 2002) y, como hemos mencionado, los estrógenos podrían inhibir la función de las células NK (Albrecht A. E., Hartmann B. W. et al. 1996; Ben-Eliyahu S., Shakhar G. et al. 2000).

Otras líneas de investigación intentaron hallar diferencias cualitativas o cuantitativas en la expresión endometrial de los ligandos para las células NK: Los trabajos publicados en este aspecto son los que siguen:

- Vigano et al., siguiendo la línea de trabajo que iniciaron en 1991, observaron en cultivos de células endometriales que la molécula de adhesión ICAM-1, expresada en varios tejidos del organismo incluido el endometrio, era en parte responsable de la adhesión de las células NK a las células del estroma endometrial, ya que la unión se bloqueaba con anticuerpos monoclonales contra esta molécula. Sugerían sin demostrarlo un posible papel en la etiopatogenia de la endometriosis en función de su mayor o menor expresión (Vigano P., Pardi R. et al. 1994).
- Fukaya et al. hallaron una mayor concentración de ICAM 1 soluble en líquido peritoneal en mujeres afectas de endometriosis, que también hallaron posteriormente Vigano et al.: se podía hipotetizar que una mayor secreción de ICAM-1 soluble por parte del endometrio bloquearía los receptores en las células NK, que de esta forma no se unirían a las células endometriales para lisarlas (Fukaya T., Sugawara J. et al. 1999; Vigano P., Somigliana E. et al. 2000).

- Semino et al. demostraron que la expresión de HLA I en cultivos de células endometriales y concretamente del subtipo HLA-B7 inhibía la lisis por parte de las células NK. La negativización de esta expresión las hacía susceptibles a la destrucción: se sugería con ello que una expresión anormalmente elevada de HLA I en células endometriales inhibiría la lisis por parte de las células NK (Semino C., Semino A. et al. 1995). En un experimento parecido de Xin et al., también *in vitro*, el incremento en la expresión de HLA I de células endometriales en cultivo, obtenido con γ -interferon, hacía estas células endometriales más resistentes a la lisis por células NK, sugiriendo alteraciones en la expresión de HLA-I para iniciar la endometriosis (Xin Y., Xu X. et al. 2000).

- Hornung et al. estudiaron la expresión de *Human Leukocyte Antigen G* (HLA-G), una molécula que pertenece a la familia HLA I no clásica y que se expresa en trofoblasto, en líquido peritoneal, endometrio y tejido endometriósico, pero no observaron expresión de esta molécula en ninguna muestra, ni en pacientes afectas ni en controles, por lo que concluyeron que no se podía atribuir a este subtipo de HLA I la resistencia del endometrio a la lisis (Hornung D., Fujii E. et al. 2001).

- Regidor et al compararon la expresión de $\alpha 6\beta 4$ en endometrio de pacientes con y sin endometriosis: estudiaron 9 mujeres con endometriosis y 16 mujeres no afectas, usando inmunohistoquímica, sin hallar diferencias (Regidor P. A., Vogel C. et al. 1998).

Todavía está por dilucidar por qué el endometrio de mujeres afectas de endometriosis es más resistente a la lisis por NK que el endometrio de mujeres no afectas. La mayoría de ensayos realizados hasta el momento de iniciar esta investigación estudiaban cultivos de células endometriales, buscando factores que blindan a las células endometriales frente a las células NK, pero no se ha demostrado diferencias in vivo que puedan explicar este fenómeno.

2. JUSTIFICACIÓN

La endometriosis continua siendo una enfermedad enigmática, aunque las últimas investigaciones apuntan a un déficit en la función del sistema inmune para mantener la cavidad peritoneal libre de detritus menstruales como un hecho crucial en la etiopatogenia. Este déficit depende de una especial resistencia del endometrio a los sistemas de “lavado” de la cavidad peritoneal, en el que las células NK tendrían un papel primordial. En la literatura existen diversos trabajos *in vitro*, en cultivos de células endometriales, que demuestran que la alteración en la expresión de moléculas implicadas en la interacción entre las células NK y el endometrio evitan la acción citolítica de las células NK sobre éste. Los diversos autores hipotetizan sobre el papel *in vivo* de estas alteraciones en la génesis de la endometriosis, pero los escasos trabajos comparando la expresión de estas moléculas en endometrio de mujeres afectas con el de mujeres no afectas todavía no lo han demostrado.

Se hace necesario estudiar *in vivo* la expresión de ligandos para las células NK en endometrio de mujeres afectas de endometriosis y compararlo con la expresión en mujeres no afectas, para poder atribuir a estas diferencias la capacidad de implantación y persistencia del endometrio en localizaciones extrauterinas. Sean los resultados en uno u otro sentido, esto permitirá avanzar de forma significativa en el estudio de la génesis de la endometriosis.

No se conoce totalmente qué moléculas están implicadas en la interacción entre las células NK y sus dianas, en este caso las células endometriales. De las identificadas hasta ahora hemos tomado para estudiar en esta tesis cuatro moléculas detectables mediante inmunohistoquímica por las siguientes razones:

- **HLA I**, una de las dos clases de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, por ser su expresión en la diana lo que determina básicamente que la célula NK se mantenga inhibida o no (Ljunggren H. G. y Karre K. 1990; O'Shea J. y Ortaldo R. 1992; Valiante N. M., Phillips J. H. et al. 1996; Yokoyama W. M. 1998; Moretta L., Bottino C. et al. 2002)

- **LFA-3**, molécula de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas expresada en epitelios entre otros tipos celulares, y que actúa de ligando para el receptor CD2 de las células NK, por estar demostrada su función manteniendo linfocitos T y células NK adheridos a sus respectivas dianas, para que ejerzan su función citolítica (O'Shea J. y Ortaldo R. 1992; Isacke C. M. y Horton M. A. 2000; Jameway C. A., Travers P. et al. 2003)

- **ICAM-1**, molécula de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresada en diversos tipos celulares incluyendo epitelios, por tener también demostrada su función de adhesión entre dianas y células NK, uniéndose al receptor LFA-1 de éstas. (O'Shea J. y Ortaldo R. 1992; Isacke C. M. y Horton M. A. 2000; Jameway C. A., Travers P. et al. 2003)

- **$\alpha 6\beta 4$** , molécula de adhesión de la familia de las integrinas, cuya expresión en endometrio es conocida (Lessey B. A., Damjanovich L. et al. 1992; Tabibzadeh S. 1992; Lanteri E., Pistrutto M. et al. 1998), por haberse demostrado que anticuerpos monoclonales dirigidos a un epítipo carbohidratado de estas integrinas determina

que las células NK no se puedan unir al epitelio secretor, tal vez a través de las lectinas tipo C activadoras de las células Natural Killer (Phillips J. H., McKinney L. et al. 1991; Yokoyama W. M. 1998; Jameway C. A., Travers P. et al. 2003)

Sería interesante estudiar la expresión de estos ligandos en el endometrio globalmente y por separado en cada fase del ciclo menstrual, debido a las variaciones que pueden ocurrir en la expresión molecular bajo la influencia hormonal (Lessey B. A. 1998), ya que las alteraciones en la expresión de estas moléculas podrían afectar a ambas fases o a una de ellas.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que se ha demostrado que el endometrio de mujeres afectas de endometriosis es más resistente a la lisis por células NK que el de mujeres no afectas, habría que descartar que este endometrio presentara alguna alteración dificultando la interacción con las células NK.

Esta alteración podría afectar a los ligandos que expresa el endometrio para las células NK, tanto en células glandulares como en células estromales. Dado que en las células NK existen receptores inhibidores y receptores activadores, las alteraciones podrían ser en dos sentidos:

- Incremento de expresión en el endometrio de las moléculas que se unen al receptor inhibidor de la célula NK (llamado KIR). Las moléculas que se unen a este receptor son las **HLA I**. Se hipotetiza que la expresión de HLA I en endometrio de mujeres afectas de endometriosis estaría aumentada.

- Disminución o alteración funcional de las moléculas que se unen a los receptores activadores de las células NK. De las identificadas hasta el momento de empezar este trabajo, se hipotetiza alteración en:
 - **LFA-3**
 - **ICAM-1**
 - **$\alpha6\beta4$**

3.2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Determinar si existen diferencias (cuantitativas o cualitativas, afectando a glándulas, estroma o ambos), entre mujeres afectas de endometriosis y mujeres no afectas, en la expresión de una o varias de las siguientes moléculas que actúan de ligandos para las células NK: **HLA I, LFA-3, ICAM-1 y $\alpha 6\beta 4$**

Objetivos secundarios:

- Determinar, en el caso de que se produzca alguna diferencia entre mujeres afectas y mujeres no afectas, si ésta se mantiene considerando las distintas fases del ciclo menstrual por separado.
- Determinar, considerando sólo el grupo de mujeres afectas de endometriosis, si existen diferencias en la expresión de las moléculas entre fase proliferativa y fase secretora, intentando establecer si la alteración, aún produciéndose en las dos fases, es más frecuente en una de ellas.
- Determinar la concordancia entre las alteraciones observadas (coincidencia de las alteraciones moleculares en una misma paciente)

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. INCLUSIÓN DE PACIENTES

Se incluyeron en el estudio aquellas pacientes en edad fértil intervenidas en nuestro Servicio durante tres años por algias pélvicas, esterilidad, masa anexial sugestiva de endometrioma o para proceder a esterilización tubárica.

- Como **grupo Control** se tomaron aquellas pacientes a las que no se observó en el momento de la laparoscopia o laparotomía ninguna evidencia de endometriosis ni otra patología genital.

- Como **grupo Endometriosis** se incluyeron aquellas pacientes en las cuales se diagnosticó como único proceso patológico endometriosis en el momento de la laparoscopia o laparotomía.

A todas las pacientes posibles candidatas a ser incluidas en el estudio se les solicitaba autorización por escrito para la obtención y procesamiento de las muestras, previa explicación de cómo se realizaba la obtención, qué posibles complicaciones podían suceder como consecuencia de ésta y, de una forma inteligible, en qué consistía el estudio, cómo se procesarían las muestras y qué información se esperaba obtener de éstas. Se les explicó que no se les comunicaría el resultado de la investigación dado que éste no supondría ningún cambio en el tratamiento ni seguimiento del cuadro clínico que presentaban. Sólo si aceptaban por escrito estas condiciones se incluían en el estudio.

Los **criterios de exclusión** fueron:

- el antecedente de alguna patología autoinmune, endocrinológica, neoplásica o ginecológica orgánica.
- la utilización actual de DIU
- la concomitancia de tratamiento hormonal y/o de tratamiento inmunomodulador en el momento de la intervención.
- El hallazgo de alguna patología endometrial en el estudio con hematoxilina-eosina del endometrio (ver recogida de muestras).

Los **datos de las pacientes** se recogieron en una hoja de datos con soporte informático File-Maker-Pro y fueron los siguientes:

- antecedentes familiares oncológicos, inmunes y de endometriosis
- tabaquismo
- antecedentes ginecológicos: menarquia, paridad, tipo menstrual, cantidad del menstruado valorada subjetivamente por la propia paciente (escaso, moderado, abundante), uso habitual de tampones, tipo de lactancia, anticonceptivos empleados, fecha de la última regla.
- motivo de consulta
- tiempo de evolución del motivo de consulta
- estadio de la endometriosis realizado en el momento de la intervención según los criterios de la *American Fertility Society*, actual *American Society for Reproductive Medicine*.

- tipo de abordaje
- tipo de intervención realizada.
- en el caso de que se diagnosticara endometriosis se realizaba una extracción en quirófano para determinar CA125 en sangre, de cara al seguimiento posterior de la paciente. Se consideraba significativo un nivel de CA125 superior a 35 UI/ml, de acuerdo con una curva ROC elaborada previamente en el Servicio.

4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

En el momento de la laparoscopia o de la laparotomía se estadiaba la enfermedad y se tomaba biopsia de las lesiones sospechosas de corresponder a endometriosis si éstas existían. A continuación se procedía a biopsia endometrial mediante legrado, para lo cual habíamos solicitado autorización por escrito a la paciente tal como se explicaba en el apartado anterior. Seguidamente se realizaba la intervención prevista (ligadura tubárica, adhesiolisis, fulguración de implantes, quistectomía, anexectomía o histerectomía con anexectomía según estuviera indicado).

4.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tejido endometriósico se incluyó en parafina y se tiñó con hematoxilina-eosina para realizar de forma diferida el diagnóstico de endometriosis. Una parte de este tejido se congeló con nitrógeno líquido para proceder a estudios en el futuro que no son objetivo de esta tesis.

El endometrio se cortó en bloques de aproximadamente 1 cm³. Parte se incluyó en parafina y se tiñó en hematoxilina-eosina con la intención de datar el endometrio y descartar posibles patologías. Otra parte se congeló ya en quirófano mediante inmersión en nitrógeno líquido para estudio inmunohistoquímico. Los bloques de tejido congelado se almacenaron en un congelador a -80°C hasta finalizar la recogida de muestras, ya que el procesamiento no se empezó hasta entonces.

Los anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio inmunohistoquímico fueron aquellos que identificaban una parte o la totalidad de las moléculas objeto del estudio, así como anticuerpos monoclonales para identificar parte o la totalidad de estos receptores en linfocitos y/o células NK infiltrando el endometrio, si estos receptores eran conocidos y disponíamos del anticuerpo monoclonal (CD2 para LFA-3 y LFA-1 para ICAM-1). Se describen a continuación los anticuerpos monoclonales utilizados:

- T52/9 para la subunidad α de LFA3, generosa donación del Profesor Sánchez-Madrid del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

- CD2, generosa donación del Profesor R. Pujol, del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, Barcelona.
- RH3a5 para ICAM1 (CD54), generosa donación del Dr. Ramón Vilella del Hospital Clínico Provincial de Barcelona
- TP 1/40 para la subunidad α de LFA-1, generosa donación del Profesor R. Pujol, del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, Barcelona
- W6/32 para un determinante monomórfico de HLA I, generosa donación del Profesor R. Pujol, del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, Barcelona.
- CA-956M para la subunidad α de $\alpha 6\beta 4$ de laboratorios Labgen, obtenido comercialmente.

Se utilizó para tinción inmunohistoquímica el método peroxidasa-antiperoxidasa. Para ello se montaron, en portas de cristal, muestras representativas de 6 μ cortadas con criostato. Se fijaron con acetona, se lavaron tres veces cinco minutos en solución buffer-fosfato y se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 0.3% para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Las secciones se lavaron nuevamente tres veces cinco minutos con solución buffer-fosfato y se preincubaron con suero normal diluido durante 15 minutos. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario a 37° durante 1 hora. Después se lavaron tres veces 10 minutos con solución buffer-fosfato y se incubaron 30 minutos con inmunoglobulina universal IG G marcada con biotina. Se procedió a un nuevo lavado con buffer-fosfato y se incubaron 30 minutos con un complejo streptavidina-biotina-peroxidasa. Se lavaron tres veces 10 minutos con buffer-fosfato y se tiñeron con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Los controles negativos se obtuvieron substituyendo el anticuerpo primario con suero no inmune. Se tomaron secciones congeladas de ganglios linfáticos como controles de positividad

externos. En algunos casos (HLA I, $\alpha\beta$ 4, LFA-3) se pudieron utilizar células endoteliales como controles de positividad internos por ser positivas en todos los casos y fáciles de identificar.

4.4. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se realizó una valoración semicuantitativa de cada una de las moléculas estudiadas, observando 10 campos no superpuestos en cada biopsia endometrial con una magnificación de x400.

Se determinó en células glandulares, estroma y endotelio el porcentaje de células positivas (expresión de la molécula en la membrana) y la distribución de esta expresión (zona basal de la célula, apical o en toda la membrana celular).

Se comparó esta expresión entre Grupo Control y Grupo Endometriosis para cada tipo celular (glándulas, estroma y endotelio).

Para aquellas moléculas en las que se procesó un número suficiente de muestras, tal como explicamos posteriormente al describir las dos fase del estudio (fase piloto y fase definitiva), se comparó esta expresión entre Grupo Control y Grupo Endometriosis considerando por separado la fase proliferativa inicial, fase proliferativa tardía, fase secretora inicial y fase secretora tardía.

4.5. FASES DEL ESTUDIO: ESTUDIO PILOTO Y ESTUDIO DEFINITIVO

El estudio de todas las moléculas seleccionadas en un número considerable de muestras no resultaba rentable desde el punto de vista de coste, tanto económico como material y humano. Planteamos por tanto dividir el estudio en dos fases:

- a) **Estudio piloto:** se procesaría 15 muestras del Grupo Control y 15 muestras del Grupo Endometriosis y en ellas se observaría la expresión de las 4 moléculas en estudio. La comparación entre Grupo Control y Grupo Endometriosis nos orientaría para elegir aquellas moléculas en las que se intuía que podía haber una diferencia estadísticamente significativa aumentando el número de muestras.

- b) **Estudio definitivo:** de las moléculas seleccionadas en la fase anterior, el estudio se ampliaría como mínimo a 30 muestras procesadas del Grupo Control y 30 del Grupo Endometriosis para observar si existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión.

El inicio del estudio piloto se realizó una vez recogidas todas las muestras, por lo que la inclusión de pacientes, los criterios de exclusión, el procesamiento de las muestras y la forma de lectura fueron los mismos en ambas fases.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para establecer la comparabilidad de ambos grupos y situar el contexto clínico en el que nos hallábamos, se compararon éstos en cuanto a edad, antecedentes familiares oncológicos, antecedentes familiares autoinmunes, antecedentes familiares de endometriosis, tabaquismo, menarquia, nuliparidad, duración media del menstruado, cantidad de menstruación, intervalo medio del menstruado, utilización de tampones, lactancia, utilización de anticonceptivos orales (ACO) en el pasado, utilización de DIU en el pasado y utilización de método barrera.

En el estudio definitivo se comparó la datación del endometrio entre ambos grupos, en las muestras que resultaron válidas para la lectura en cada caso. Para ello se dividieron las pacientes en cuatro grupos en función de la datación histológica que se había realizado: fase proliferativa “inicial” (datación 1-7), fase proliferativa “tardía” (datación 8-14), fase secretora “inicial” (datación 15-21) y fase secretora “tardía” (datación 22-28).

Se comparó la expresión molecular entre ambos grupos, en las muestras que resultaron válidas para lectura. La comparación entre ambos grupos se realizó de la siguiente forma:

- Todas las muestras de ambos grupos, estuvieran en fase proliferativa o en fase secretora, tanto en el estudio piloto como en el estudio definitivo.

Además, en el estudio definitivo, cuando el número de muestras fue suficiente, se comparó la diferencia en la expresión molecular entre grupo Control y grupo Endometriosis en los siguientes subgrupos:

- Aquellas muestras cuya datación correspondía a una fase proliferativa
- Aquellas muestras cuya datación correspondía a una fase secretora
- Aquellas muestras cuya datación correspondía a una fase proliferativa “inicial”
- Aquellas muestras cuya datación correspondía a una fase proliferativa “tardía”
- Aquellas muestras cuya datación correspondía a una fase secretora “inicial”
- Aquellas muestras cuya datación correspondía a una fase secretora “tardía”

Por último, en el estudio definitivo, considerando sólo el grupo Endometriosis se comparó:

- La expresión molecular en la fase proliferativa con la expresión molecular en la fase secretora.

El soporte informático utilizado fue SPSS. Se aplicó:

- Test del Chi² y test exacto de Fisher cuando fue pertinente.
- T de Student y U de Mann-Whitney en función de si la distribución era normal o no.
- Test de correlación de Kappa.

Se consideró significativa una $p \leq 0.05$

5. RESULTADOS

5.1.- DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN SOMETIDA A ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio 76 pacientes que cumplían los criterios descritos en el apartado de *Material y Método*, 31 del grupo Control y 45 de grupo Endometriosis. A continuación describimos las características de las pacientes de cada grupo en cuanto a antecedentes familiares, personales y diagnóstico de la enfermedad.

5.1.1. Antecedentes familiares y personales

Se resumen en la siguiente tabla

Tabla 2: Antecedentes familiares y personales

	GRUPO CONTROL	GRUPO ENDOMETRIOSIS
Edad (media y desviación típica)	33.95 ± 3.358	32.94 ± 7.280
Antecedentes familiares oncológicos	5/31 (16%)	7/45 (15%)
Antecedentes familiares autoinmunes	0/31 (0%)	3/45 (6%)
Antecedentes familiares de endometriosis	0/31 (0%)	3/45 (6%)
Tabaquismo	14/31 (45%)	20/45 (44%)
Menarquia (media y desviación típica)	11.60 ± 1.505	12.5 ± 1.664
Nuliparidad	13/31 (36%)	21/45 (46%)
Duración del menstruo (media y desviación típica)	4.17 ± 1.132	5.11 ± 1.863
Cantidad del menstruo	Escasa 14/31 (45%) Moderada 17/31 (55%) Abundante 0/31 (0%)	Escasa 4/45 (9%) Moderada 26/45 (58%) Abundante 15/45 (33%)
Intervalo del menstruo (media y desviación típica)	27.2 + 2.291	28.5 + 3.551
Uso de tampones	20/31 (64.5%)	29/45 (64.4%)
Lactancia materna	8/18 (44%)	16/24 (66%)
Utilización en el pasado de ACO*	11/31 (35%)	12/45 (27%)
Utilización en el pasado de DIU**	3/31 (9%)	2/45 (4%)
Método barrera	3/31 (9%)	2/45 (4%)

*ACO= anticonceptivos orales

**DIU= dispositivo intrauterino

Estudio estadístico:

- Edad: T de Student 0.680, $p=0.500$, no significativo.
- Antecedentes familiares oncológicos: Test exacto de Fisher 0.064, $p=0.800$, diferencia no significativa.
- Antecedentes familiares autoinmunes: Test exacto de Fisher 0.753, $p=0.385$, diferencia no significativa.
- Antecedentes familiares de endometriosis: Test exacto de Fisher 0.753, $p=0.385$, diferencia no significativa.
- Tabaquismo: Chi2 0.945, $p=0.331$, diferencia no significativa.
- Menarquia: T de Student 1.541, $p=0.130$, diferencia no significativa.
- Nuliparidad: Chi2 0.166, $p=0.683$, diferencia no significativa.
- Duración media del mestruo: T de Student 1.903, $p=0.663$, diferencia no significativa.
- Cantidad del menstruo: Chi2 20.558, **$p=0.001$** , diferencia significativa.
- Intervalo del menstruo: T de Student 1.123, $p=0.268$, diferencia no significativa.
- Utilización de tampones: Chi2 0.000, $p=0.995$, diferencia no significativa.
- Lactancia materna: Chi2 2.074, $p=0.148$, diferencia no significativa.
- Utilización de ACO en el pasado: Chi2 0.676, $p=0.410$, diferencia no significativa.
- Utilización de DIU: test exacto de Fisher 0.188, $p=0.664$, diferencia no significativa.
- Utilización de método barrera: test exacto de Fisher 0.188, $p=0.664$, diferencia no significativa

5.1.2. Enfermedad actual y tratamiento

Los datos de motivo de la consulta, tiempo de evolución, tipo de abordaje, intervención practicada y patología miometrial en la histerectomía se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 3: Enfermedad actual y tratamiento

		G. CONTROL	G. ENDOMETRIOSIS
Motivo de la consulta	Ligadura tubárica	13	0
	Esterilidad	9	6
	Dismenorrea	3	10
	Algias pélvicas	6	17
	Tumoración anexial	0	12
Duración media de los síntomas (meses)		49.49 (15-90)	7.59 (1-96)
Abordaje quirúrgico	Laparoscopia	31	13
	Laparotomía	0	32
Tipo de intervención	Ligadura tubárica	13	0
	Exploradora	10	0
	Adhesiolisis	8	3
	Quistectomía	0	19
	Anexectomía	0	2
	Histerectomía con anexectomía uni o bilateral	0	21
Estadio AFSr*		No procede	I – 4 II – 6 III – 14 IV - 21
Puntuación media AFSr*		No procede	38.56 (rango 4-150)
CA 125 > 35 UI/ml		No procede	36/45 (80%)
Nivel medio de CA125 UI/ml		No procede	126 (rango 11-539)

AFS r: clasificación revisada de la *American Fertility Society*.

5.2.- RESULTADO DEL ESTUDIO PILOTO

Se procesaron las muestras de las primeras 15 pacientes de cada grupo incluidas en la investigación, tal como se había previsto, y se estudió la expresión de todas las moléculas en estudio. Los resultados se describen a continuación.

5.2.1. Expresión de LFA-3 (y CD2)

En el grupo Control, de las 15 muestras procesadas, 7 fueron válidas para la lectura y 8 se invalidaron (2 por material insuficiente obtenido en la recogida de muestras, 6 por congelación inadecuada del tejido). En el Grupo Endometriosis también se desecharon 6 muestras (2 por material insuficiente en la recogida de muestras, 4 por congelación inadecuada del tejido).

La expresión de LFA-3 en el **grupo Control** se describe a continuación:

- Se observó en el 100% de células glandulares en 7/7 pacientes, siempre en la zona basal y en la membrana intercelular;
- En 100% de células endoteliales en 7/7 pacientes
- Se observó menos del 20% de células estromales positivas para LFA-3 en 7/7 pacientes.

La expresión de LFA-3 en el **Grupo Endometriosis** fue idéntica al grupo Control:

- 100% de células glandulares en la zona basal y membrana intercelular en 9/9 pacientes
- 100% de células endoteliales en 9/9 pacientes
- menos del 20% de células estromales en 9/9 pacientes.

La expresión de CD2 se producía en células aisladas o agrupadas en el estroma en ambos grupos.

No existían pues diferencias en la expresión entre ambos grupos y decidimos no ampliar el número de casos para esta molécula. El resultado se resume en la siguiente tabla:

Tabla 4: Expresión de LFA-3, estudio piloto

LFA-3	Endotelio 100%	Glandulas 100%	Estroma <20%
Estudio piloto		Basal- intercelular	
G. CONTROL	7/7	7/7	7/7
G. ENDOMETRIOSIS	9/9	9/9	9/9

Figura 4: Expresión de LFA-3, paciente 47, grupo control. Magnificación óptica $\times 400$.

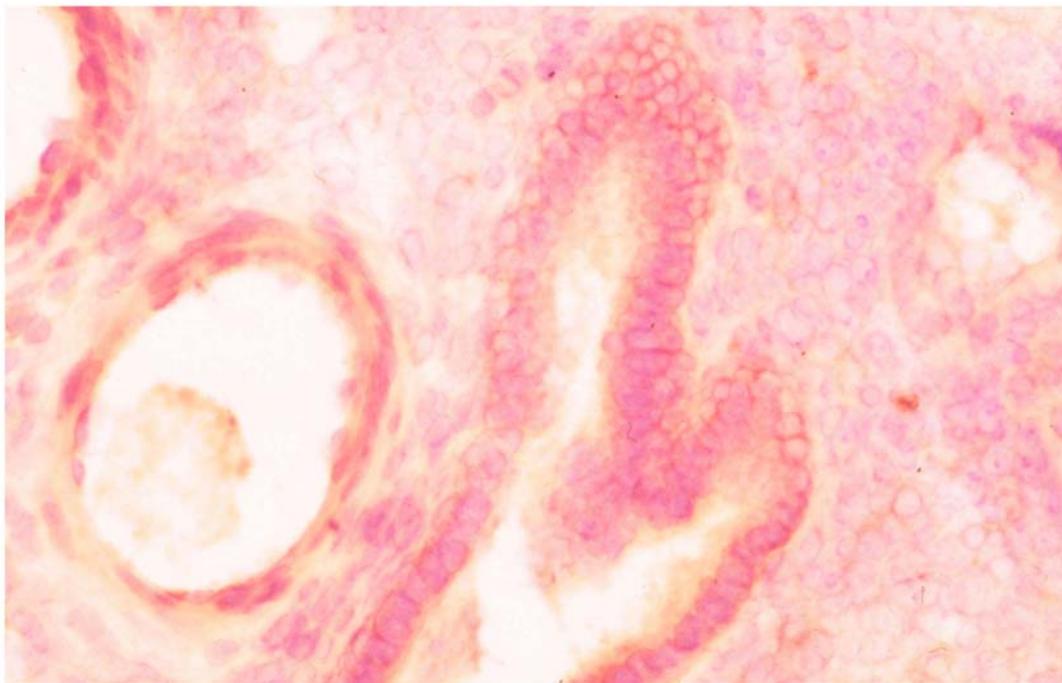
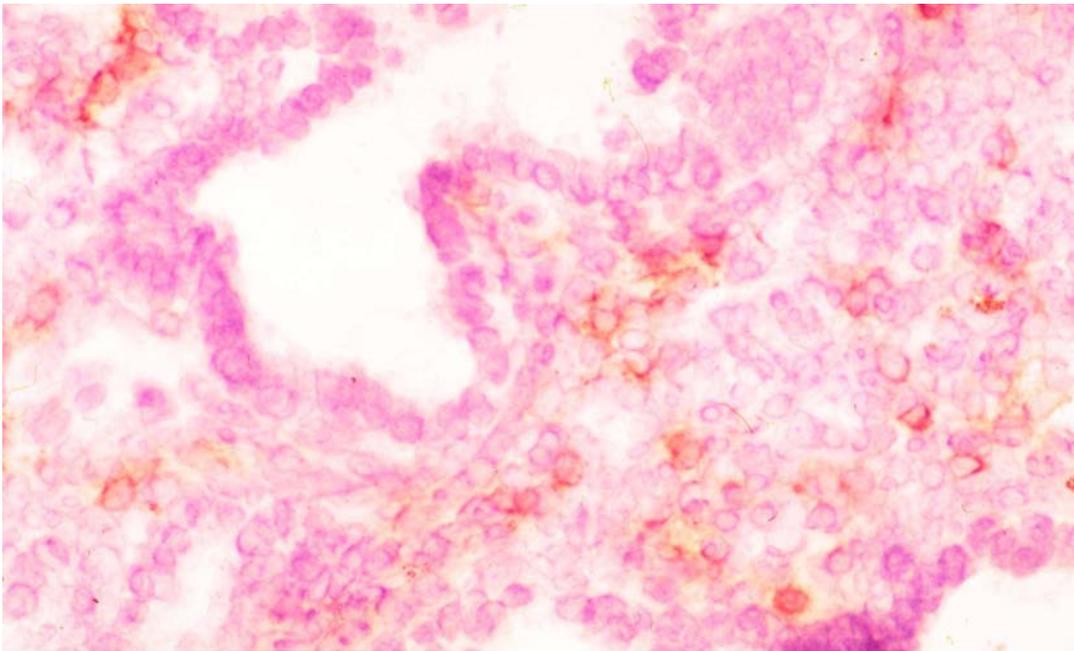


Figura 5: Expresión de CD-2, paciente 47, grupo Control. Magnificación óptica $\times 400$.



5.2.2. Expresión de ICAM-1 (y LFA-1)

Tanto en el Grupo Control como en el Grupo Endometriosis 9 muestras fueron válidas y 6 ilegibles (en cada grupo, 2 por material inadecuado en la recogida de muestras y 4 por congelación inapropiada).

En el **grupo Control** la expresión de ICAM-1 fue igual en las 9 muestras valoradas:

- Se observó en el 100% de las células endoteliales

- En el 0% de las células glandulares

- Aisladamente en células del estroma, a veces formando pequeñas agrupaciones.

La expresión en las 9 muestras del **grupo Endometriosis** fue exactamente igual, no observando pues ninguna diferencia entre los dos grupos.

Se estudió la expresión de LFA-1 en las 9 muestras válidas de cada grupo, observando expresión en células aisladas o formando pequeños grupos en el estroma.

No existían pues diferencias en la expresión de estas moléculas entre ambos grupos y se decidió no ampliar el número de muestras para esta molécula. El resultado se resume en la siguiente tabla:

Tabla 5: Expresión de ICAM-1, estudio piloto

ICAM-1	Vasos 100%	Glándulas 0%	Estroma (aisladas)
Estudio piloto			
G. CONTROL	9/9	9/9	9/9
G. ENDOMETRIOSIS	9/9	9/9	9/9

Figura 6: Expresión de ICAM-1, paciente 53, grupo Endometriosis. Magnificación óptica $\times 400$.

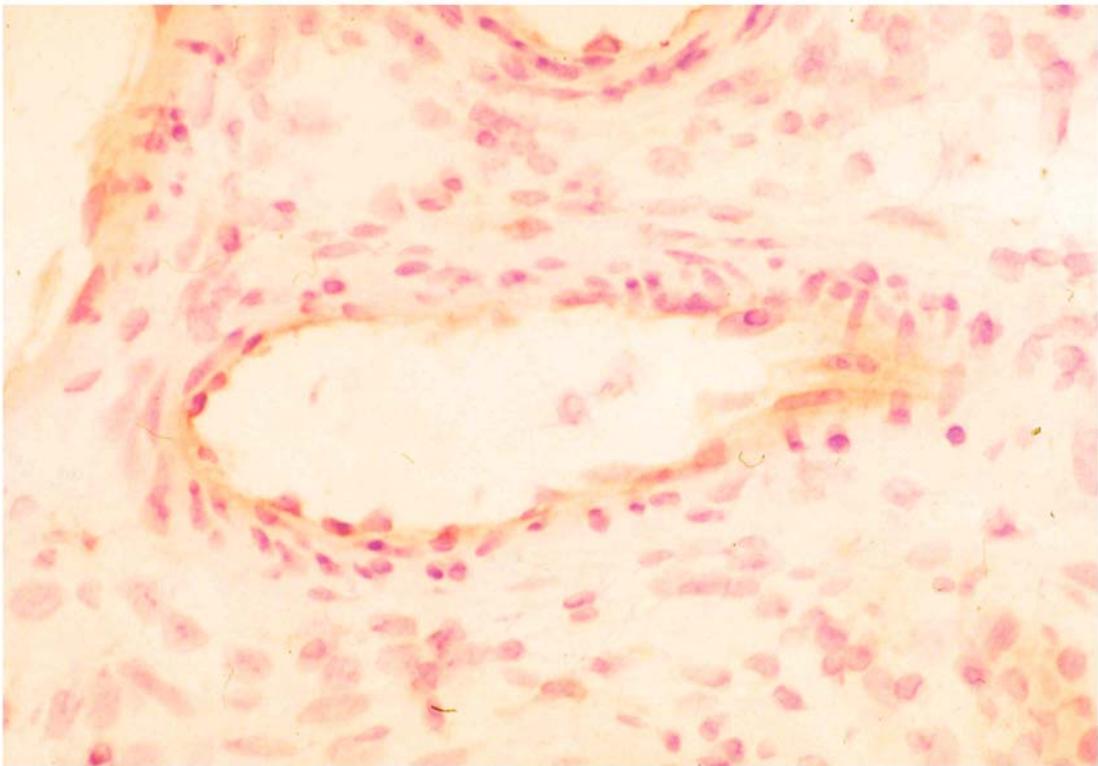
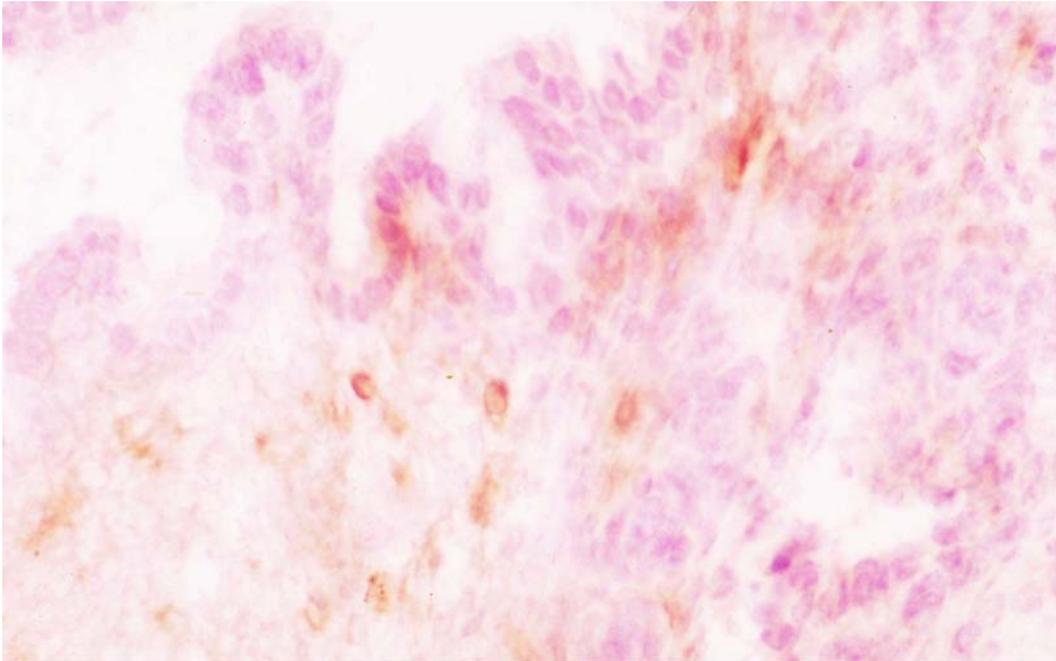


Figura 7: Expresión de LFA-1, paciente 32, grupo Endometriosis. Magnificación óptica x400.



5.2.3. Expresión de $\alpha6\beta4$

La expresión de $\alpha6$ fue legible en 10/15 muestras procesadas del grupo Control (2 muestras desechadas por material insuficiente en la recogida, 3 por congelación inadecuada) y en 13/15 muestras del grupo Endometriosis (2 casos desechadas por material inadecuado en la recogida de muestras).

En el **grupo Control** se observó expresión de $\alpha6$ en:

- el 100% de células endoteliales en 10/10 casos
- en 10/10 muestras el estroma era negativo
- en el 100% de las células glandulares con dos patrones distintos: en 1/10 la expresión era en toda la membrana celular y en 9/10 en la cara basal de la célula.

La expresión en el **grupo Endometriosis** se observó:

- en el 100% de las células endoteliales en las 13 muestras
- en ningún caso se observó expresión en el estroma

- en 13/13 muestras se observó expresión en el 100% de las células glandulares, también con dos patrones distintos: 8/13 presentaban expresión en toda la membrana celular y 5/13 presentaban expresión sólo en la cara basal de la célula.

Existía pues una diferencia no en el porcentaje de expresión de $\alpha 6$ entre ambos grupos pero sí en el patrón: **90%** de expresión basal en el grupo control contra un **38%** en el grupo Endometriosis. El Test exacto de Fisher fue 4.325, **p=0.0376**, una diferencia por tanto significativa (mayor porcentaje de expresión en toda la membrana celular en el grupo Endometriosis), por lo que se decidió proseguir el estudio con esta molécula. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 6: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio piloto

$\alpha 6\beta 4$ Estudio piloto	Vasos 100%	Glándulas		Estroma negativo
		Basal	Celular	
G. CONTROL	10/10	9/10	1/10	10/10
G. ENDOMETRIOSIS	13/13	5/13	8/13	13/13

Test exacto de Fisher 4.325, p=**0.0376**

5.2.4. Expresión de HLA-I

En el grupo Control 9/15 muestras fueron válidas (2 desechadas por material insuficiente en la recogida, 4 por congelación inadecuada) y en el Grupo Endometriosis 10/15 (2 por material insuficiente en la recogida, 3 por congelación inadecuada).

La expresión de HLA I se observaba en el 100% de células endoteliales por lo que se tomó como control interno de positividad.

La expresión en glándulas y estroma se distribuyó tal como se resume en las siguientes tablas:

Tabla 7: Grupo Control, expresión de HLA-I, estudio piloto.

GRUPO CONTROL	HLA I glándulas	HLA I estroma
1	100%	70%
2	100%	10%
3	10%	10%
4	80%	30%
5	50%	20%
6	50%	20%
7	80%	40%
8	50%	20%
9	70%	10%

Tabla 8: Grupo Endometriosis, expresión de HLA-I, estudio piloto

GRUPO ENDOMETRIOSIS	HLA I glándulas	HLA I estroma
1 (estadio I)	100%	50%
2 (estadio II)	100%	30%
3 (estadio III)	100%	20%
4 (estadio IV)	100%	90%
5 (estadio IV)	100%	20%
6 (estadio IV)	100%	10%
7 (estadio IV)	40%	80%
8 (estadio IV)	10%	100%
9 (estadio IV)	100%	90%
10(estadio IV)	100%	100%

Lo que observamos aquí fue que HLA I se expresaba siempre en toda la membrana celular pero en el siguiente porcentaje de células:

- La expresión glandular de HLA I oscilaba entre el 10 y el 100% en el grupo Control (mediana 72, percentil 25= 50, percentil 75= 92).
- La expresión glandular de HLA I oscilaba entre el 10 y el 100% en el grupo Endometriosis (mediana 100, percentil 25=75, percentil 75=100)
- La expresión en estroma oscilaba entre el 10 y el 70% en el grupo Control (mediana 20, percentil 25= 10, percentil 75= 39)
- La expresión en estroma oscilaba entre el 10 y el 100% en el grupo Endometriosis (mediana 72, percentil 25 =20, percentil 75=94).

Al aplicar una U de Mann-Whitney para comparar la expresión en glándulas y estroma se observó:

- Expresión en glándulas, U de Mann-Whitney 24.5, **p= 0.095**, diferencia no significativa:
- Expresión en estroma, U de Mann-Whitney 20.0, **p=0.043, diferencia significativa.**

Existía pues un mayor porcentaje de células estromales y glandulares en el grupo Endometriosis en el que se detectaba expresión de HLA I, y en el estroma la diferencia llegaba a la significación estadística. Dado lo sugerentes que eran estos resultados, se decidió ampliar el estudio de esta molécula

5.3. ESTUDIO DEFINITIVO: EXPRESIÓN DE $\alpha 6\beta 4$

En la fase definitiva del estudio se procesó el material del que se disponía, 31 muestras del grupo Control y 45 del grupo endometriosis. Para la expresión de la subunidad $\alpha 6$ de la integrina $\alpha 6\beta 4$, 19/31 muestras del grupo Control y 30/45 del grupo Endometriosis fueron valorables. En el grupo Control 5 muestras se desecharon por material insuficiente en la recogida y 7 por congelación inadecuada. En el grupo Endometriosis 7 pacientes se desecharon por material insuficiente en la recogida y 8 por congelación inadecuada.

5.3.1 Distribución de casos y controles en función de la fase del ciclo.

Considerando sólo las muestras en las que se había podido determinar la subunidad $\alpha 6$ en el estudio definitivo, se observó que el número de pacientes en fase secretora era significativamente más elevado en el grupo Control que en el grupo Endometriosis. De hecho sólo existían 4 pacientes en fase proliferativa en el grupo Control y se hallaban en fase proliferativa tardía. Esta situación se resume en la siguiente tabla.

Tabla 9: Estudio definitivo, determinación de $\alpha 6\beta 4$. Distribución de controles y casos en función de la fase del ciclo menstrual.

	G. CONTROL	G. ENDOMETRIOSIS	TOTAL
Proliferativa "inicial"	0	8	8
Proliferativa "tardía"	4	7	11
Secretora "inicial"	4	8	12
Secretora "tardía"	11	7	18
TOTAL	19	30	59

Test exacto de Fisher **p=0.026**

En el grupo Endometriosis 2 pacientes presentaban un estadio I, 2 pacientes un estadio II, 11 pacientes un estadio III y 15 pacientes en estadio IV.

5.3.2. Resultado en la expresión de $\alpha 6\beta 4$ comparando todas las muestras

En el grupo **Control** los resultados fueron los siguientes:

- No se observaba expresión de $\alpha 6$ en el estroma
- Las células endoteliales eran positivas en el 100% en la zona basal del endotelio (control interno de positividad)
- Las células glandulares eran positivas en el 100%. El patrón de expresión en las glándulas era en la cara basal en 16/19 (84.3%) y en toda la membrana celular en 3/19 (15.7%). Tres pacientes con expresión en toda la célula correspondían a dos

pacientes multíparas sometidas a ligadura tubárica y una paciente nulípara afecta de algias pélvicas.

En el grupo **Endometriosis** se observaba:

- Ausencia de expresión de $\alpha 6$ en células estromales
- La expresión en endotelio era del 100%
- La expresión en glándulas endometriales era en el 100% de las células. El patrón de expresión en las glándulas era en la cara basal en 10/30 (33.3%) de las muestras mientras que 20/30 (66.6%) presentaban expresión en toda la membrana celular. De las pacientes que presentaban expresión basal en el grupo Endometriosis, una estaba en un estadio II, 2 un estadio III y 7 un estadio IV. De las que presentaban expresión en toda la célula, 2 correspondían a un estadio I, 1 a un estadio II, 9 a un estadio III y 8 a un estadio IV.

Al comparar la expresión de $\alpha 6$ en células glandulares entre ambos grupos, se observó una expresión en toda la membrana celular significativamente más frecuente en el grupo Endometriosis comparando con el grupo Control (Chi2 12.09, **p=0,001**). Se resume en la siguiente tabla:

Tabla 10: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo. Comparación entre ambos grupos considerando todas las muestras en conjunto, independientemente de la fase del ciclo.

$\alpha 6\beta 4$	CONTROL	ENDOMETRIOSIS
GLÁNDULAS	N=19	N=30
BASAL	16 (84.2%)	10 (33.3%)
CELULAR	3 (15.8%)	20 (66.6%)

.. Chi2 12.09, **p=0,001**

5.3.3. Expresión de $\alpha 6\beta 4$ comparando las muestras en fase proliferativa.

En este caso, dado que no existían muestras en el grupo Control en fase proliferativa “inicial”, sólo se comparó la fase proliferativa globalmente.

En 4/4 muestras del grupo Control en fase proliferativa la expresión era en la zona basal. En 5/15 muestras en fase proliferativa del grupo Endometriosis la expresión era en la zona basal y en 10/15 muestras la expresión se producía en toda la membrana celular. La diferencia era significativa aplicando un test exacto de Fisher (**p=0.033**). Se resume en la siguiente tabla.

Tabla 11: Estudio definitivo, expresión de $\alpha 6\beta 4$, comparación entre muestras en fase proliferativa.

$\alpha 6\beta 4$ Glándulas	CONTROL	ENDOMETRIOSIS
Fase proliferativa	N= 4	N= 15
Basal	4	5
Celular	0	10

Test de Fisher **p= 0.033**

5.3.4. Expresión de $\alpha 6\beta 4$ comparando las muestras en fase secretora.

Comparando las muestras que se hallaban en fase secretora la diferencia entre ambos grupos seguía siendo estadísticamente significativa: un mayor porcentaje de pacientes en el grupo endometriosis presentaba expresión en toda la célula en lugar de expresión en la zona basal. Se resume en la siguiente tabla:

Tabla 12: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo, comparación entre muestras en fase secretora.

$\alpha 6\beta 4$ Glándulas	CONTROL	ENDOMETRIOSIS
Fase secretora	N= 15	N= 15
Basal	12	5
Celular	3	10

Chi2 7.429 **p= 0.011**

Esta diferencia no era significativa si sólo considerábamos las pacientes en fase **secretora inicial**. El resultado se resume en la siguiente tabla:

Tabla 13: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo, comparación entre muestras en fase secretora inicial.

$\alpha 6\beta 4$ Glándulas	CONTROL	ENDOMETRIOSIS
Fase secretora inicial	N= 4	N= 8
Basal	3	3
Celular	1	5

Test de Fisher **p= 0.545**

La diferencia volvía a ser estadísticamente significativa al comparar las muestras en fase secretora tardía. El resultado se resume en la siguiente tabla:

Tabla 14: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo. Comparación entre muestras en fase secretora tardía.

$\alpha 6\beta 4$ Glándulas	CONTROL	ENDOMETRIOSIS
Fase secretora tardía	N= 11	N= 7
Basal	9	2
Celular	2	5

Test de Fisher **p= 0.049**

5.3.5. Comparación entre fase proliferativa y fase secretora del grupo Endometriosis.

Se comparó el patrón de expresión de $\alpha6\beta4$ entre muestras en fase proliferativa y muestras en fase secretora del grupo Endometriosis. No se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de muestras que expresaban la molécula en toda la célula, dado que en ambas fase era exactamente el mismo (66.6%). El resultado se resume en la siguiente tabla.

Tabla 15: Expresión de $\alpha6\beta4$ comparando fase proliferativa y fase secretora del grupo Endometriosis.

$\alpha6\beta4$ grupo	Fase proliferativa	Fase secretora
Endometriosis	N= 15	N= 15
Basal	5	5
Celular	10	10

Chi 2 **p= 1.000**

Figura 8: Expresión basal (polarizada) de $\alpha6\beta4$, paciente 60, grupo Control. Magnificación óptica $\times 400$.

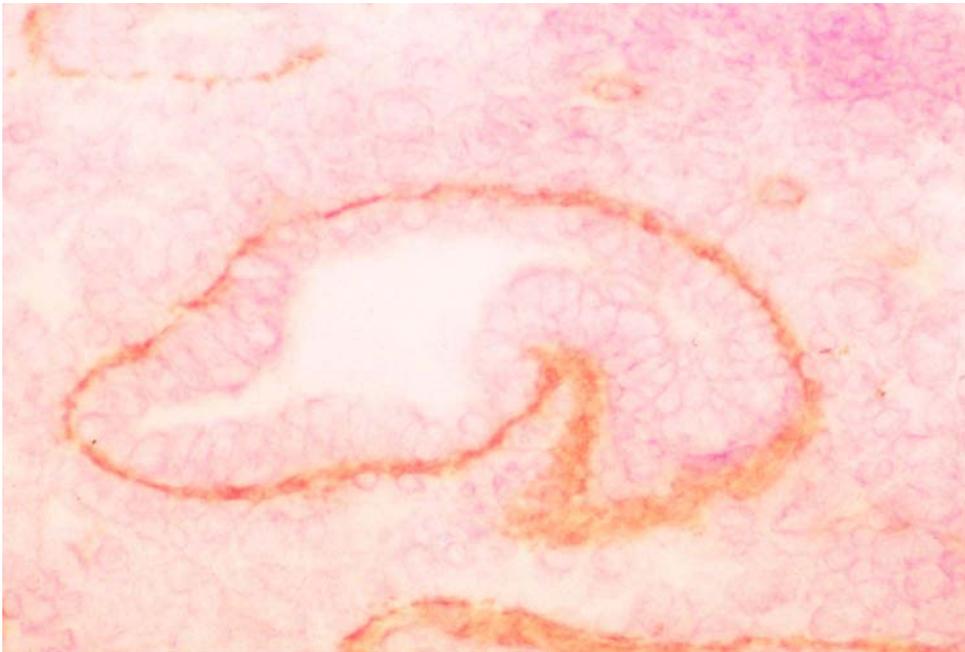
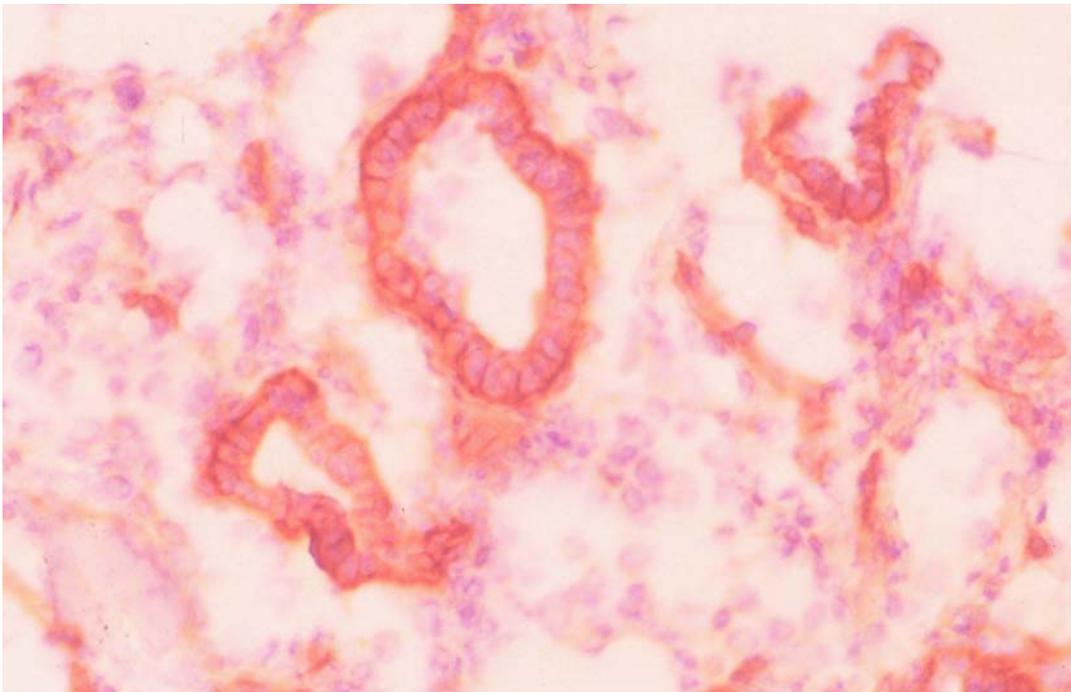


Figura 9: Expresión en toda la membrana celular (despolarizada) de $\alpha 6 \beta 4$, paciente 44, grupo Endometriosis. Magnificación óptica $\times 400$.



5.4.- ESTUDIO DEFINITIVO: EXPRESIÓN DE HLA I

Del material disponible, 31 muestras del grupo Control y 45 del grupo Endometriosis, fueron válidas 15 y 25 muestras respectivamente. En el grupo Control 5 muestras se desecharon por material insuficiente en la recogida de muestras y 11 por congelación inadecuada. En el grupo Endometriosis 7 muestras se desecharon por material insuficiente y 13 por congelación inadecuada.

5.4.1 Distribución de casos y controles en función de la fase del ciclo.

En este caso, ambos grupos fueron comparables por el día del ciclo establecido en el estudio anatomopatológico dado que aplicando un test de Fisher no existían diferencias estadísticamente significativas ($p=0.062$). Este resultado se resume en la siguiente tabla.

Tabla 16: Estudio definitivo, determinación de HLA I. Distribución de controles y casos en función de la fase del ciclo menstrual.

	G. CONTROL	G. ENDOMETRIOSIS	TOTAL
Proliferativa “inicial”	0	7	7
Proliferativa “tardía”	4	6	10
Secretora “inicial”	1	4	5
Secretora “tardía”	10	8	18
TOTAL	15	25	40

Test exacto de Fisher $p=0.062$

En el grupo Endometriosis, siguiendo la clasificación revisada de la *American Fertility Society*, 1 paciente presentaba endometriosis estadio I, 1 paciente endometriosis estadio II, 9 estadio III y 14 estadio IV.

5.4.2. Resultado en la expresión de HLA I comparando todas las muestras

La expresión de HLA I se producía siempre en toda la membrana celular, como en el estudio piloto.

En el grupo Control, la expresión de HLA I considerando globalmente ambas fases del ciclo se describe a continuación:

- Oscilaba entre el 10 y 100% en células glandulares del endometrio, con una mediana de expresión del 80% (percentil 25=50%, percentil 75=100%)
- Oscilaba entre 10 y 40% en células del estroma, con una mediana del 20% (percentil 25=10%, percentil 75=30%)..
- Las células endoteliales eran siempre positivas ofreciendo un control de positividad interno válido, igual que en el estudio piloto.

Se describe la expresión en el grupo Control en la siguiente tabla:

Tabla 17: Grupo Control, expresión de HLA-I, estudio definitivo.

Paciente		% glándulas	% estroma
Nº caso	Datación		
1	8	100	10
2	10	100	10
3	13	10	10
4	14	80	30
5	16	50	20
6	24	50	20
7	25	80	40
8	25	20	20
9	25	100	10
10	26	100	10
11	27	70	10
12	28	50	20
13	28	100	70
14	28	100	70
15	28	50	20

Las casillas sombreadas corresponden a fase secretora.

En el grupo Endometriosis la expresión de HLA I era:

- En las células glandulares oscilaba entre el 10 y el 100%, con una mediana del 100% (percentil 25=100%, percentil 75=100%)

- En el estroma oscilaba entre el 10 y el 100%, con una mediana del 60% (percentil 25=20%, percentil 75=80%).

- Expresión en el 100% de células endoteliales.

La expresión en el grupo Endometriosis se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 18: Grupo Endometriosis, expresión de HLA-I, estudio definitivo.

ESTADIO	CASO N°	DATA CIÓN	% GLÁNDULAS	% ESTROMA
I	1	24	100	50
II	2	28	100	30
III	3	5	100	20
	4	8	100	60
	5	11	100	10
	6	12	100	20
	7	14	100	80
	8	16	100	80
	9	20	100	80
	10	23	20	40
	11	23	100	80
IV	12	4	100	10
	13	4	50	60
	14	4	100	20
	15	5	100	10
	16	7	100	80
	17	7	40	80
	18	10	100	60
	19	11	100	10
	20	16	10	100
	21	21	100	80
	22	26	100	60
	23	27	100	80
	24	28	100	100
	25	28	100	90

Las casillas sombreadas corresponden a fase secretora.

El análisis estadístico mostró:

- La expresión de HLA I era significativamente más elevada en células glandulares del grupo Endometriosis respecto a células glandulares del grupo Control (U de Mann-Whitney 115, **p=0.043**)

- La expresión de HLA I era significativamente más elevada en células estromales del grupo Endometriosis respecto a células estromales del grupo Control (U de Mann-Whitney 83.5, **p=0.003**)

El análisis estadístico se resume en la siguiente tabla:

Tabla 19: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras considerando ambas fases globalmente.

		G. CONTROL N=15	G. ENDOMETRIOSIS N=25
HLA glándulas	Mediana	80	100
	Rango	10-100	10-100
	p25-p75*	50-100	100-100
HLA estroma	Mediana	20	60
	Rango	10-70	10-100
	p25-p75*	10-30	20-80

U de Mann-Whitney glándulas 115.00 p=0.043

U de Mann-Whitney estroma 83.5 p=0.003

* percentil 25 – percentil 75

5.4.3. Expresión de HLA I comparando las muestras en fase proliferativa

Se comparó la expresión de HLA I entre los dos grupos considerando sólo las muestras que se hallaban en fase proliferativa. Dado que todas las muestras del grupo Control se hallaban en fase proliferativa “tardía” y no había ninguna en fase proliferativa “inicial”, no se pudieron realizar nuevas comparaciones considerando estos subgrupos.

El resultado del análisis estadístico comparando sólo la fase proliferativa se resume en la siguiente tabla:

Tabla 20: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras en fase proliferativa.

		G. CONTROL N=4	G. ENDOMETRIOSIS N=13
HLA glándulas	Mediana	90	100
	Rango p25-p75*	10-100 28-100	40-100 100-100
HLA estroma	Mediana	10	20
	Rango p25-p75*	10-30 10-30	10-80 10-70

U de Mann-Whitney glándulas 17.00 **p=0.350**

U de Mann-Whitney estroma 13.0 **p=0.163**

* percentil 25 – percentil 75

No se observaban por tanto diferencias significativas ni en glándulas ni en estroma comparando sólo la fase proliferativa.

5.4.4. Expresión de HLA I comparando las muestras en fase secretora

Se comparó la expresión de HLA I entre los dos grupos considerando sólo las muestras que se hallaban en fase secretora. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 21: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras en fase secretora.

HLA I Fase Secretora		G. CONTROL N=11	G. ENDOMETRIOSIS N=12
HLA glándulas	Mediana	70	100
	Rango p25-p75*	20-100 50-100	10-100 100-100
HLA estroma	Mediana	20	80
	Rango p25-p75*	10-70 10-40	30-100 53-88

U de Mann-Whitney glándulas 41.5 $p=0.134$

U de Mann-Whitney estroma 9.5 $p=0.000$

* percentil 25 – percentil 75

Por tanto, considerando sólo muestras en fase secretora, la expresión de HLA I era significativamente más elevada en estroma pero la significación se perdía para las células glandulares.

No se comparó la expresión de HLA I entre ambos grupos considerando por separado la fase secretora “inicial” porque sólo había una muestra del grupo Control en esta fase.

Se comparó la expresión de HLA I considerando sólo las muestras que se hallaban en fase secretora “tardía”. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 22: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras en fase secretora tardía.

HLA I Fase secretora tardía		G. CONTROL N=10	G. ENDOMETRIOSIS N=8
HLA glándulas	Mediana	78	100
	Rango p25-p75*	20-100 50-100	20-100 93-100
HLA estroma	Mediana	20	70
	Rango p25-p75*	10-70 10-53	30-100 44-91

U de Mann-Whitney glándulas 23.5 p=0.146

U de Mann-Whitney estroma 9.5 p=0.004

* percentil 25-percentil 75

El resultado era superponible al que se producía considerando la fase secretora globalmente: seguía existiendo una diferencia estadísticamente significativa en el estroma endometrial, en el sentido de que las mujeres afectas de endometriosis presentaban mayor expresión de HLA I. La diferencia no era significativa para las glándulas.

5.4.5. Comparación entre fase proliferativa y fase secretora del grupo Endometriosis

A continuación se comparó la expresión de HLA I entre muestras en fase proliferativa y muestras en fase secretora del grupo Endometriosis. Se observó una expresión significativamente más elevada en estroma de muestras en fase secretora comparando con células estromales de muestras en fase proliferativa. Esta diferencia no se producía en las glándulas.

Este resultado se resume en la siguiente tabla:

Tabla 23: Comparación de la expresión de HLA I entre muestras en fase proliferativa y muestras en fase secretora del grupo Endometriosis.

HLA I GRUPO ENDOMETRIOSIS		Fase proliferativa N=13	Fase secretora N=12
HLA glándulas	Mediana	100	100
	Rango p25-p75*	40-100 100-100	10-100 100-100
HLA estroma	Mediana	20	80
	Rango p25-p75*	10-80 10-70	30-100 53-88

U de Mann-Whitney glándulas 75 $p=0.894$

U de Mann-Whitney estroma 30 $p=0.008$

* percentil 25- percentil 75

Figura 10: Expresión de HLA I, paciente 46, grupo Control. Glándulas 50%, estroma 20%.

Magnificación óptica $\times 400$.

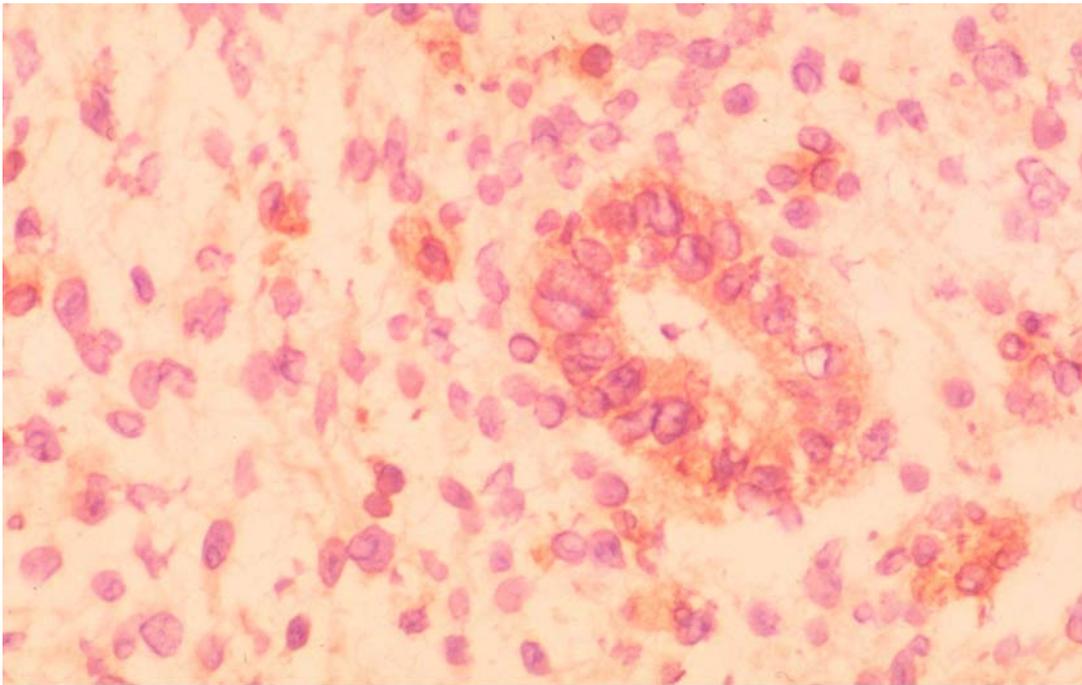
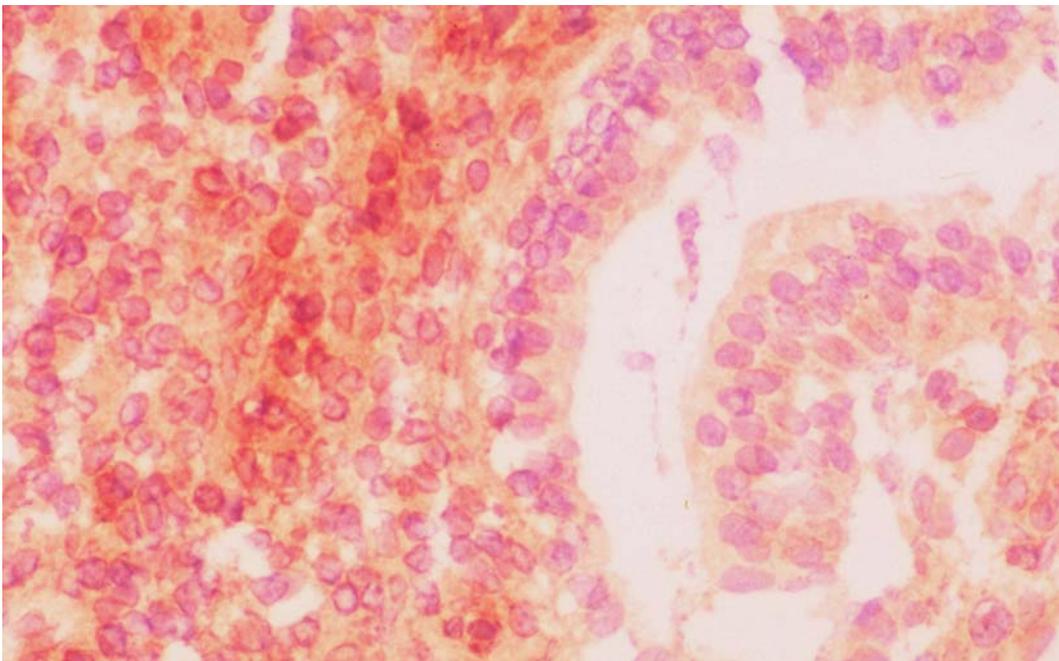


Figura 11: Expresión de HLA I, paciente 51, grupo Endometriosis. Glándulas 10%, Estroma 100%. Magnificación óptica $\times 400$.



5.5. ESTUDIO DEFINITIVO: CONCORDANCIA ENTRE LAS ALTERACIONES

Se consideró que se habían hallado tres alteraciones en la expresión de moléculas en el grupo Endometriosis respecto al grupo Control: expresión más frecuente de $\alpha 6\beta 4$ en toda la membrana celular en lugar de la parte basal (expresión despolarizada), elevada expresión de HLA I en células glandulares y elevada expresión de HLA I en células estromales.

La concordancia entre HLA I y $\alpha 6\beta 4$ se realizó en aquellas pacientes en las que habían sido valorables las muestras para ambas moléculas (15 en el grupo Control, 22 en el grupo Endometriosis). Para determinar qué nivel de expresión de HLA I se consideraba alterado, se tomó como punto de corte en la expresión de HLA I el 100% en las glándulas y superior al 20% en el estroma: ambos puntos de corte eran los que menos errores nos proporcionaban a la hora de clasificar a las pacientes entre casos y controles tal como se expresa en las siguientes tablas de contingencia:

Tabla 24: Distribución de casos y controles en función de una expresión de HLA I en glándulas igual o inferior al 100% de las células.

	Grupo Control	Grupo Endometriosis
Expresión en glándulas <100%	9	4
Expresión en glándulas del 100%	6	21

Tabla 25: Distribución de casos y controles en función de una expresión de HLA I en estroma superior al 20% de las células.

	Grupo Control	Grupo Endometriosis
Expresión en estroma $\leq 20\%$	11	7
Expresión en estroma $> 20\%$	4	18

En la siguiente tabla de contingencia se resume la concordancia entre la expresión de HLA I en células glandulares y la expresión de HLA I en células estromales, tomando los puntos de corte descritos:

Tabla 26: Concordancia en la expresión de HLA I entre glándulas y estroma

		HLA I en glándulas		Total
		<100%	100%	
HLA I en estroma	≤20	7 (53.8%)	11 (40.7%)	18 (45%)
	>20	6 (46.2%)	16 (59.3%)	22 (55%)
Total		13 (100%)	27 (100%)	40 (100%)

Kappa 0.119, N.S.

Se obtuvo un valor de Kappa de 0.119 lo cual significa que no existía concordancia entre ambas alteraciones.

El mismo ejercicio se realizó para observar la concordancia entre la expresión de HLA I en glándulas y la expresión de $\alpha\beta4$. Se resume en la siguiente tabla de contingencia:

Tabla 27: Concordancia entre la expresión de HLA-I en las glándulas y la expresión de $\alpha\beta4$.

		Expresión HLA I		
		glándulas		
		<100	100	
Expresión $\alpha\beta4$	Basal	10 (76.9%)	12 (50%)	22 (59.5%)
	Célula	3 (23.1%)	12 (50%)	15 (40.5%)
Total		13 (100%)	24 (100%)	37 (100%)

Kappa 0.232, N.S.

En la medida de concordancia el valor de Kappa era 0.232, lo que suponía que no existía concordancia.

Finalmente se realizó la misma tabla de contingencia para establecer la concordancia entre la expresión de HLA I en el estroma y la expresión de $\alpha 6\beta 4$:

Tabla 28: Concordancia entre la expresión de HLA I en el estroma y expresión de $\alpha 6\beta 4$.

		Expresión HLA I estroma		Total
		≤ 20	> 20	
Expresión de $\alpha 6\beta 4$	Basal	13 (72.2%)	9 (47.4%)	22 (59.5%)
	Célula	5 (27.8%)	10(52.6%)	15 (40.5%)
Total		18 (100%)	19 (100%)	

Kappa 0.247, N.S.

En este caso se obtuvo un Kappa de 0.247, no existiendo pues concordancia.

Por último se recogió, en aquellas pacientes en que se pudieron valorar ambas moléculas, cuántas pacientes de cada grupo presentaban una, dos o tres de las “alteraciones” descritas en la expresión de las moléculas (expresión en toda la membrana celular de $\alpha\beta4$, expresión de HLA I en glándulas del 100% y expresión de HLA I en el estroma superior al 20%). Se resume en la siguiente tabla:

Tabla 29: Número de pacientes en cada grupo que presentaban cero, una, dos o tres de las “alteraciones”

		G. Control	G. Endometriosis	Total
Nº alteraciones	0	6 (40%)	0 (0%)	6 (16.2%)
	1	6 (40%)	6 (27.3%)	12 (32.4%)
	2	3 (20%)	8 (36.4%)	11 (29.7%)
	3	0 (0%)	8 (36.4%)	8 (21.6%)
Total		15 (100%)	22 (100%)	37 (100%)

Chi2 15.503, p=0.001

- La diferencia en cuanto a número de alteraciones fue significativa entre ambos grupos a favor de un número de pacientes con dos o tres alteraciones más elevado en el grupo Endometriosis: Chi2 15.503, **p= 0.001**.
- Ninguna paciente del grupo Control presentaba las tres alteraciones
- Ninguna paciente del grupo Endometriosis presentaba cero alteraciones.

6. DISCUSIÓN

6.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

Al final del periodo de recogida de las muestras se obtuvieron 76 pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión, ninguno de los criterios de exclusión y que consintieron participar en el estudio. Por desgracia no se pudieron obtener resultados en la expresión de las moléculas de todas estas muestras. Problemas en la obtención, en la congelación y especialmente en el almacenaje llevaron a que algunas muestras se estropearan o resultaran ilegibles una vez ya procesadas. El estudio definitivo se basa en 19 muestras del grupo Control y 31 del grupo Endometriosis para la expresión de $\alpha6\beta4$ y en 15 muestras del grupo Control y 25 del grupo Endometriosis para la expresión de HLA I. En 15 pacientes del grupo Control y en 22 del grupo Endometriosis se consiguió valorar la expresión de ambas moléculas a la vez. Aunque en un momento determinado esto consiguió desmoralizarnos en cuanto al rendimiento que habíamos obtenido, después de tantos meses de trabajo, repasar los otros artículos publicados sobre expresión de moléculas en endometrio y endometriosis, detectada mediante inmunohistoquímica, nos animó de nuevo, ya que la mayoría de trabajos se han realizado como mucho sobre 30 casos (Lanteri E., Pistrutto M. et al. 1998; Regidor P. A., Vogel C. et al. 1998; Prefumo F., Semino C. et al. 2002).

En una primera fase, lejos de querer sacar ninguna conclusión epidemiológica y con la mera intención de establecer la comparabilidad de los grupos y de situar el contexto clínico en el que nos hallábamos, comparamos la edad, los antecedentes familiares, los antecedentes personales y los antecedentes ginecológicos. Determinamos si ambos grupos eran comparables en algunas cuestiones básicas, como la edad y la

paridad, y contrastamos el resultado de algunos de estos aspectos con lo que se había publicado en la literatura.

Los dos grupos fueron comparables en cuanto a edad y a paridad, sin diferencias estadísticamente significativas. La media de edad fue ligeramente más alta para el grupo Control (33.95 vs 32.94), lo cual se podría explicar por la inclusión de ligaduras tubáricas en este grupo, que se suelen realizar en mujeres de cierta edad con el deseo genésico cumplido.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en cuanto a antecedentes oncológicos en la familia (16% en el grupo Control vs 15% en el grupo Endometriosis). Wyshak G et al. sugieren una asociación entre endometriosis y melanoma, observando una mayor incidencia de estas neoplasias en la familia de las pacientes afectas de endometriosis (Wyshak G. y Frisch R. E. 2000). En nuestro estudio sólo una paciente del grupo Endometriosis refería antecedentes familiares de melanoma frente a ninguna en el grupo Control, aunque desde luego el pequeño tamaño de la muestra ni confirma ni desmiente la asociación hallada por este autor.

Aunque las diferencias tampoco eran estadísticamente significativas, sí llamaba la atención que en el grupo Endometriosis existían antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes que no aparecían en el grupo Control, en consonancia con las alteraciones inmunes que se describen en la endometriosis (Iborra A., Palacio J. R. et al. 2000; Gitlits V. M., Toh B. H. et al. 2001; Yeaman G. R., Collins J. E. et al. 2002): el pequeño número de la muestra convierte esta observación en una mera sugerencia.

También sin diferencias estadísticamente significativas, se observaron antecedentes de endometriosis en la familia del grupo Endometriosis que no se observaron en el grupo Control: en este caso esta asociación familiar sí la han demostrado otros autores y el porcentaje observado aquí coincide con los publicados, un 6% (Simpson J. L., Elias S. et al. 1980; Hadfield R. M., Mardon H. J. et al. 1997; Stefansson H., Geirsson R. T. et al. 2002). La falta de significación estadística se debería también en este caso al pequeño número de la muestra.

No observamos entre ambos grupos ninguna diferencia en cuanto a tabaquismo (45% en el grupo Control, 44% en el grupo Endometriosis, χ^2 0.945, $p=0.331$), como Cramer et al., que observaban relación entre tabaquismo severo de inicio temprano y menor incidencia de endometriosis, al parecer porque estas mujeres tendrían menores niveles de estrógenos (Cramer D. W., Wilson E. et al. 1986).

Recogimos también los datos sobre factores que podían suponer una mayor exposición al flujo menstrual y mayor riesgo de endometriosis según algunos autores (Cramer D. W., Wilson E. et al. 1986; Darrow S. L., Vena J. E. et al. 1993; Parazzini F. y Ferraroni M. 1993; Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995): la edad de la menarquía (grupo Control 11.6, grupo Endometriosis 12.5, T de Student 1.541, $p=0.130$), duración del menstruado (grupo Control 4.17, grupo Endometriosis 5.11, T de Student 1.903, $p=0.663$) y el intervalo del menstruado (grupo Control 27.2, grupo Endometriosis 28.5, T de Student 1.123, $p=0.268$) eran comparables, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El uso de tampones, asociado a un mayor riesgo por Darrow et al. (Darrow S. L., Vena J. E. et al. 1993), era prácticamente idéntico entre ambos grupos, 64.5% en el grupo Control y 64.4% en el grupo

Endometriosis. La lactancia entre pacientes no nulíparas, curiosamente, era más frecuente en el grupo Endometriosis sin diferencias significativas (44% vs 66%, Chi2 2.07, $p=0.148$): lactancia se suele asociar a más periodos de amenorrea, lo que parecería conferir cierta protección frente a la endometriosis y esperaríamos hallar lactancia materna más frecuentemente en el grupo Control. El porcentaje de nulíparas era más alto en el grupo Endometriosis, lo cual coincide con la nuliparidad como factor de riesgo y al incremento de esterilidad que supone la endometriosis: de todas formas se explica también por existir en el grupo Control ligaduras tubáricas que no existen en el grupo Endometriosis (en ninguna mujer que consultó para esterilización quirúrgica se halló foco alguno de endometriosis). Esta diferencia no fue significativa.

Sí se hallaron diferencias en la apreciación subjetiva que la mujer hacía de la cantidad de su menstruación: un porcentaje significativamente más alto de pacientes del grupo Endometriosis consideraba que el flujo era moderado o abundante (91% vs 55%, Chi2 20.558, $p=0.001$): esto concuerda con los estudios de Cramer et al. (Cramer D. W. y Missmer S. A. 2002) y Darrow et al. (Darrow S. L., Vena J. E. et al. 1993) en cuanto a que la cantidad de flujo es un factor de riesgo para desarrollar endometriosis.

Respecto al método anticonceptivo, la utilización de anticonceptivos orales en el pasado era más frecuente en el grupo Control sin diferencias significativas (35% vs 27%, Chi2 0.676, $p=0.410$) al contrario de lo que hallaban Sangi-Haghpeykar et al., Vessey et al. y Parazzini et al. en sus estudios (Parazzini F. y Ferraroni M. 1993; Vessey M. P., Villard-Mackintosh L. et al. 1993; Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995). La utilización de DIU fue también más frecuente en el grupo Control sin diferencias significativas (9% vs 4%, test exacto de Fisher 0.188, $p=0.664$): por los trabajos de

Vessey et al. y Sangi-Haghpeykar et al., el porcentaje debería ser a la inversa (Vessey M. P., Villard-Mackintosh L. et al. 1993; Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd 1995). Estas diferencias con la literatura publicada se deberían sobretodo al pequeño tamaño de nuestra muestra, aunque hay que considerar que los propios autores en sus trabajos reconocen que en las asociaciones halladas entre uso de anticonceptivos orales en el pasado y uso de DIU en el pasado y endometriosis pueden existir varios sesgos.

Con intención meramente descriptiva recogimos los datos en ambos grupos sobre motivo de consulta, duración de los síntomas, tipo de abordaje quirúrgico, tipo de intervención realizada, el estadio revisado de la *American Fertility Society* y los niveles de CA 125. A destacar que en el grupo Control la causa más frecuente de consulta fue la esterilización tubárica (42%) y en el grupo Endometriosis las algias pélvicas (38%) como síntoma principal, seguido de la tumoración anexial hallada en el curso de una revisión ginecológica (27%). En ningún caso de ligadura tubárica se diagnosticó endometriosis y todos los casos de tumoración anexial corresponden al grupo Endometriosis porque cualquier otra patología ginecológica orgánica era criterio de exclusión para el estudio.

Cabe comentar que la media de duración de los síntomas en el caso de que existieran era superior en el grupo Control (49.49 meses vs 7.59 meses): ello puede explicarse porque en el grupo Control existen tres casos más de esterilidad, que incrementan la media de duración de los síntomas respecto a las mujeres que presentan algias, que son las más frecuentes en el grupo Endometriosis, dado que cabe pensar que las pacientes afectas de algias probablemente consulten antes.

El abordaje quirúrgico fue sólo laparoscópico en el grupo Control dado que no había ningún motivo para reconvertir a laparotomía al no hallarse patología alguna. De las 32 laparotomías que se realizaron en el grupo Endometriosis, 20 (las que no correspondían a tumoración anexial) se iniciaron como laparoscopias que se reconvirtieron en laparotomía a criterio del cirujano. Las 12 pacientes con tumoración anexial se iniciaron directamente como laparotomía. El tipo de intervención realizado, dejando aparte la toma de muestras para el estudio que se realizó en todos los casos tal como se indica en material y métodos, quedaba a criterio del cirujano y lo decidido conjuntamente con la paciente, igual que en cualquier otro acto médico-quirúrgico.

El estadio de la endometriosis se establecía en el momento de la laparoscopia o laparotomía cuando existía la enfermedad: a destacar que 35/45 pacientes (78%) eran estadios III o IV y que el 80% de las pacientes presentaban niveles de CA 125 de más de 35 UI/ml y por tanto patológicos, con una media de CA 125 de 126 UI/ml (rango 11-539). Por tanto, casi el 80% de los casos que componían el grupo Endometriosis presentaban enfermedad en un grado moderado-severo.

6.2. LA EXPRESIÓN DE LFA-3

LFA-3 (también identificado como CD58) constituía un buen candidato para buscar un posible defecto de los ligandos expresados en el endometrio para los receptores de las células NK. Como hemos referido en el capítulo de antecedentes, se trata de una molécula de adhesión expresada extensamente en el organismo, incluyendo células epiteliales (Pigott R. y Power C. 1993), cuyo receptor, CD2, se expresa en linfocitos T y células NK (O'Shea J. y Ortaldo R. 1992; Pigott R. y Power C. 1993; Jameway C. A., Travers P. et al. 2003). Su función es la de mantener la unión entre la célula NK y su diana para que se pueda producir el efecto citotóxico. Investigaciones recientes han destacado el papel de esta interacción entre la célula NK y su diana: de su expresión depende que se produzca una fuerte unión entre la célula NK en reposo, no estimulada por citocinas, y su diana (Barber D. F. y Long E. O. 2003); de su densidad en la diana depende la fuerza de la unión con la célula NK (Garcia-Penarrubia P., Lorenzo N. et al. 2002). Fletcher et al. han demostrado que baja densidad de expresión de LFA-3 en la diana puede hacer que ésta eluda la lisis por NK, incluso siendo la expresión de HLA I escasa, que como veíamos en la introducción es el determinante principal para la susceptibilidad a la citotoxicidad NK (Fletcher J. M., Prentice H. G. et al. 1998).

Hemos hallado sólo dos trabajos en la literatura que describan la expresión de LFA-3 en endometrio: el de Brackin MN et al., en el que utilizan citometría de flujo para estudiar el estroma endometrial para establecer cual es la expresión normal de LFA-3, entre otras moléculas; y el de Prefumo et al., en el que comparan la expresión de LFA-3 e ICAM-1 en el endometrio de mujeres afectas de endometriosis con la expresión en el

de mujeres no afectas. Ambos estudios se publicaron el año 2002, después de realizada la parte experimental del nuestro (Brackin M. N., Cruse J. M. et al. 2002; Prefumo F., Semino C. et al. 2002).

Nosotros pudimos comprobar que, estudiada mediante inmunohistoquímica, la expresión de LFA-3 en endometrio se observa tanto en glándulas, como en estroma (aunque en menos del 20% de las células), como en el endotelio, en consonancia con los resultados obtenidos por Brackin et al. y Prefumo et al. Sin embargo en el estudio piloto no observamos ningún tipo de diferencia entre el grupo Control y el grupo Endometriosis por lo que decidimos no proseguir el estudio en esta línea. El escaso número de casos en el estudio piloto no descarta esta línea de trabajo totalmente, aunque el estudio de Prefumo et al., realizado mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo en 10 pacientes con endometriosis y 12 controles, tampoco halla diferencias entre ambos grupos para LFA-3 (Prefumo F., Semino C. et al. 2002).

6.3. LA EXPRESIÓN DE ICAM-1

ICAM-1 era otra molécula de adhesión que valía la pena investigar en relación a la resistencia a la lisis de células endometriales frente a células NK, en tanto que su papel como molécula de adhesión en las dianas para su interacción con las células NK está bien establecido (O'Shea J. y Ortaldo R. 1992; Isacke C. M. y Horton M. A. 2000; Jameway C. A., Travers P. et al. 2003). Este papel se confirma en recientes trabajos que demuestran claramente su función en la interacción de las células NK en reposo con su diana (Barber D. F. y Long E. O. 2003). La firmeza de esta unión depende, igual que sucedía con el LFA-3, de la densidad de expresión de esta molécula en la diana (García-Penarrubia P., Lorenzo N. et al. 2002).

La expresión de ICAM-1 en endometrio ha sido estudiada en diversas ocasiones y los resultados no han sido siempre superponibles. Tabibzadeh et al. detectaron mediante inmunohistoquímica intensa expresión de ICAM-1 en células endoteliales, células linfoides y de forma regular, aunque mucho menos intensa, en estroma, células glandulares y epitelio superficial; no observaron diferencias entre muestras en fase proliferativa y muestras en fase secretora (Tabibzadeh S. S. y Poubouridis D. 1990; Tabibzadeh S., Kong Q. F. et al. 1994). Sin embargo Tawia et al., también mediante inmunohistoquímica, sólo observaban expresión de ICAM-1 en endotelio: la expresión en estroma se limitaba al periodo menstrual y las glándulas eran siempre negativas (Tawia S. A., Beaton L. A. et al. 1993). Un trabajo más reciente de Thomson et al., con inmunohistoquímica y cuantificación de RNA mensajero para ICAM 1, confirma expresión de ICAM-1 en endotelio, estroma y células epiteliales, con incremento de la expresión durante la menstruación (Thomson A. J., Greer M. R. et al. 1999). En relación

a la expresión en endometrio de mujeres con endometriosis, sólo hemos hallado un trabajo publicado posteriormente a la realización de la parte experimental del nuestro, que hemos mencionado en el apartado anterior, el de Prefumo et al. (Prefumo F., Semino C. et al. 2002). En él, por inmunofluorescencia y citometría de flujo, no por inmunohistoquímica, hallaron menor expresión de ICAM-1 en células endometriales durante la fase secretora en mujeres afectas de endometriosis, al comparar con la expresión en endometrio de mujeres no afectas: la resistencia del endometrio a la lisis por NK en mujeres con endometriosis podría atribuirse a este defecto, que dificultaría la unión de la célula NK al endometrio.

Nosotros en el estudio piloto no hallamos prácticamente expresión de ICAM I en glándulas y estroma endometrial, tanto en el de mujeres sanas como en el de mujeres afectas de endometriosis, a pesar de que el control externo e interno de positividad eran positivos siempre (el endotelio de las muestras expresaba claramente ICAM-1 en todos los casos) y por tanto no podía atribuirse el resultado a problemas técnicos. Este resultado es similar al que obtuvieron Tawia et al. en su trabajo (Tawia S. A., Beaton L. A. et al. 1993). Pensamos que la expresión de ICAM-1 en endometrio es lo suficientemente débil para que en algunos casos la inmunohistoquímica sea negativa y en otros débilmente positiva. En todo caso, dado este resultado en el estudio piloto, idéntico para el grupo Control y el grupo Endometriosis, decidimos no proseguir el trabajo en esta línea porque la rentabilidad que podíamos suponer para el estudio de la molécula con nuestra técnica era nula. Se haría recomendable estudiar la expresión de ICAM-1 con técnicas más sensibles, tal como hicieron posteriormente el grupo de Prefumo et al., cuyos resultados son sumamente interesantes (Prefumo F., Semino C. et al. 2002).

6.4. LA EXPRESIÓN DE $\alpha 6\beta 4$

En el estudio piloto y posteriormente en el definitivo observamos que la expresión de $\alpha 6\beta 4$ en glándulas se producía en todas las células, pero presentaba una alteración: se observaba en toda la membrana celular, es decir, de forma despolarizada, en un porcentaje significativamente mayor en el grupo Endometriosis que en el grupo Control. Esta diferencia significativa se mantenía si comparábamos sólo las muestras en fase proliferativa y si comparábamos sólo las muestras en fase secretora. Considerando sólo la fase secretora “inicial” la diferencia dejaba de ser significativa y en fase secretora tardía lo era de nuevo.

Una primera reflexión que queremos realizar en cuanto al anticuerpo monoclonal que utilizamos para detectar $\alpha 6\beta 4$ es que se trataba de un anticuerpo dirigido a la subunidad $\alpha 6$. Con ello estábamos detectando al mismo tiempo la subunidad $\alpha 6$ de la integrina $\alpha 6\beta 1$, una molécula de adhesión de la familia de las integrinas que también actúa de anclaje con el medio extracelular, como la $\alpha 6\beta 4$, pero cuya expresión en el endometrio es débil y sólo en el estroma endometrial (Lessey B. A., Damjanovich L. et al. 1992; Bridges J. E., Prentice A. et al. 1994). El tipo de distribución nos permitía saber si estábamos detectando una u otra integrina. En nuestro caso no llegamos a detectar subunidad $\alpha 6$ en el estroma.

La expresión de $\alpha 6\beta 4$ en el endometrio es conocida desde hace varios años: se expresa de forma intensa en la zona basal del endotelio y en la zona basal de las células glandulares (Lessey B. A., Damjanovich L. et al. 1992; Tabibzadeh S. 1992; Bridges J. E.,

Prentice A. et al. 1994). La mayoría de autores coinciden en que no se producen modificaciones en la expresión de $\alpha6\beta4$ durante el ciclo, ni en relación a los niveles hormonales (van der Linden P. J., de Goeij A. F. et al. 1995; Murray M. J., Zhang J. et al. 1999; Park K. R., Inoue T. et al. 2000), excepto Lanteri et al., que hallan una disminución en la expresión en glándulas endometriales al tiempo que un incremento en superficie endometrial durante la ventana de implantación (Lanteri E., Pistritto M. et al. 1998).

Como objetivo secundario de la tesis planteamos determinar, en aquellas moléculas que se estudiasen en la fase definitiva, si las diferencias observadas entre grupo Endometriosis y grupo Control se mantenían durante el ciclo endometrial y además si dentro del grupo Endometriosis existían diferencias en la expresión entre fase proliferativa y fase secretora. El motivo de plantear este objetivo secundario era que la expresión de varias moléculas, según estudios de Lessey et al., tiene dependencia hormonal (Lessey B. A. 1998), aunque como mencionábamos antes esto no parecería cumplirse para la integrina $\alpha6\beta4$, al menos según los estudios realizados con inmunohistoquímica y a falta de otros estudios con técnicas más sensibles. De todas formas en el caso de las muestras en las que se estudió la expresión de esta integrina, existía una diferencia significativa en el sentido de que el porcentaje de muestras en fase secretora era más alto en el grupo Control que en el grupo Endometriosis: era importante establecer si la diferencia en la expresión polarizada se podía atribuir al desequilibrio en cuanto a la fase del ciclo entre ambos grupos. Sin embargo pudimos observar que la diferencia en el patrón de expresión se mantenía comparando las muestras en fase proliferativa y en fase secretora, así como en fase secretora tardía. Sólo dejaba de ser significativa en fase secretora inicial, y aunque ello podría deberse al escaso

número de muestras en esta fase: estudios con más pacientes deberían confirmar o desmentir esta pérdida de significación. Observamos también que el porcentaje de muestras del grupo Endometriosis que presentaban expresión despolarizada era exactamente el mismo en fase proliferativa y en fase secretora, un 66.6%. Todo ello parecería apoyar la idea que la expresión de integrina $\alpha6\beta4$ y la alteración de esta expresión serían independientes de factores endocrinos, en la línea que defienden la mayoría de autores que han estudiado esta molécula.

Sólo hemos hallado un trabajo en la literatura comparando la expresión de $\alpha6\beta4$ en pacientes con y sin endometriosis: se trata de un estudio de Regidor et al. (Regidor P. A., Vogel C. et al. 1998) en el que comparan la expresión de $\alpha6\beta4$ en el endometrio de 9 mujeres con endometriosis con la expresión en el endometrio de 16 mujeres no afectas, usando también inmunohistoquímica, sin hallar diferencias. Describen la expresión en la zona basal de la glándula y no informan de ningún cambio en el patrón de expresión de esta integrina. Estos resultados no se corresponden pues con los nuestros, dado que en nuestro trabajo observamos diferencias estadísticamente significativas en cuanto al patrón de expresión entre los dos grupos tanto en el estudio piloto como al ampliar el número de casos en el estudio definitivo (expresión despolarizada 15.8% en el grupo Control, 66.6% en el grupo Endometriosis).

¿Qué significado tiene esta pérdida en la polaridad de la integrina $\alpha6\beta4$? Si bien no hemos hallado trabajos que describan este fenómeno en el endometrio, sí existen

para otros epitelios, como la piel, en los que diversos autores asocian la pérdida de polaridad con pérdida de función (De Luca M., Pellegrini G. et al. 1994; Witkowski C. M., Bowden G. T. et al. 2000). Esta pérdida de función puede tener múltiples consecuencias en tanto que la integrina $\alpha6\beta4$ se ha implicado en numerosos papeles en el organismo. Su función más estudiada es la de receptor para la laminina, manteniendo la unión del epitelio a la membrana basal: mutaciones en los genes que codifican las dos cadenas que componen esta integrina explican enfermedades dermatológicas como la epidermolisis bullosa (Hogg N. y Bates P. A. 2000). En cultivos de células esofágicas (Sashiyama H., Shino Y. et al. 2002), en mucosa intestinal (Lussier C., Basora N. et al. 2000) y en piel (De Luca M., Pellegrini G. et al. 1994) la pérdida de función se asocia a células rápidamente proliferantes que pierden el anclaje a la membrana basal: cabría pensar que el endometrio de estas mujeres tendría mayor velocidad de proliferación. Los distintos autores que han intentado establecer si el endometrio de mujeres con endometriosis prolifera más rápidamente que el de mujeres sanas han obtenido resultados contradictorios, por lo que hasta la fecha no existen conclusiones claras al respecto (Scotti S., Regidor P. A. et al. 2000; Sharpe-Timms K. L. 2001)

En los últimos años se están descubriendo nuevas funciones para la integrina $\alpha6\beta4$. Así, Mercurio et al. la localizan en protusiones de membrana asociadas a la migración celular, como lamelopodios y filopodios de células de tumores agresivos. Los autores relacionan esta reubicación de la expresión no con una pérdida de función, sino con un incremento en la capacidad de migración e invasión de estas células, no siempre dependiente de la laminina, sino asociada a otras funciones que posee la molécula. Así la $\alpha6\beta4$ estimula enzimas no relacionados con la interacción con el medio extracelular, por ejemplo la fosfatidilinositol 3-kinasa, fundamental para la migración quimiotáctica de

células derivadas del epitelio (Mercurio A. M., Rabinovitz I. et al. 2001). La $\alpha6\beta4$ también coopera con varios receptores para factores de crecimiento: recientemente se ha comprobado que estimula el VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular (Chung J., Bachelder R. E. et al. 2002). Aplicando esto al endometrio de mujeres afectas de endometriosis, se sugeriría que la pérdida de polaridad observada podría corresponder al intento por parte de la célula endometrial de adoptar un fenotipo con capacidad de migración, con protusiones, expresando $\alpha6\beta4$ de forma parecida a como lo harían las células neoplásicas e incrementando las funciones antes descritas. Nuevos estudios deberían realizarse en este sentido para aclarar este punto.

Por otro lado, y en la relación a la hipótesis planteada en esta tesis, Phillips et al. describían que el bloqueo de un epítopo carbohidratado de esta molécula inhibe la unión de las células NK al epitelio: en este caso se podría suponer que la pérdida de polaridad y por ende, la pérdida de función de esta integrina, tal como sugieren De Luca et al. y Witkowski et al. (De Luca M., Pellegrini G. et al. 1994; Witkowski C. M., Bowden G. T. et al. 2000), dificultaría la interacción de la célula NK con su diana, aquí la célula endometrial, explicando la mayor resistencia a la lisis del endometrio. De hecho la importancia de la polaridad de las moléculas de adhesión en la interacción entre la célula NK y su diana está descrita para otras moléculas de adhesión: Nieto et al. han descrito que la pérdida de polaridad de ICAM-1 e ICAM-3, tanto en la célula NK como en la célula diana, supone una dificultad para que se unan y dificultad en consecuencia para que se produzca la citolisis (Nieto M., Navarro F. et al. 1998). Una investigación a realizar en el futuro sería la de enfrentar NK a endometrio con expresión polarizada y a endometrio con expresión despolarizada, determinando el grado de citolisis en cada caso.

En resumen, teniendo en cuenta que las funciones de la integrina $\alpha6\beta4$ son mucho más complejas de lo que hasta hace poco se creía, la pérdida de polaridad significa consecuencias en varios aspectos de la dinámica celular: por ahora sabemos que significaría alteraciones en la capacidad de unión a la membrana basal, podría suponer alteraciones en la unión con las células NK y podría significar la adopción de un fenotipo celular con capacidad de migración parecido al de las células neoplásicas.

Cabría plantearnos qué ha hecho perder la polaridad en la distribución de $\alpha6\beta4$: la polaridad de las moléculas de adhesión en las células NK depende de su estimulación por citocinas (Nieto M., Navarro F. et al. 1998). En el endometrio, factores autocrinos, paracrinos y endocrinos determinarían la expresión de las integrinas en general según Lessey et al (Lessey B. A. 1998). Por los estudios antes mencionados en el caso de la integrina $\alpha6\beta4$ los factores endocrinos no parecerían ser importantes (van der Linden P. J., de Goeij A. F. et al. 1995; Murray M. J., Zhang J. et al. 1999; Park K. R., Inoue T. et al. 2000) y deberíamos inclinarnos por factores autocrinos y paracrinos, aunque no hemos hallado referencias literarias al respecto. Otra posibilidad sería estudiar mutaciones en el cromosoma 2, donde se codifica la subunidad $\alpha6$ (Isacke C. M. y Horton M. A. 2000) y en el cromosoma 17 (concretamente 17q-11-qter), donde se codifica la subunidad $\beta4$ (Isacke C. M. y Horton M. A. 2000), dado que ello podría explicar parte de la agregación familiar en la endometriosis. De todas formas esta última posibilidad significaría tal vez un defecto de expresión no sólo en células endometriales, sino también en otras células y en nuestro caso la expresión en células endoteliales era siempre en la zona basal, sin pérdida de polaridad, en todas las muestras.

Un último aspecto que queremos comentar es que está en controversia si la endometriosis se inicia por el componente estromal o por el componente glandular. Así en el trabajo de Vigano et al. en el que se demostraba aumento de resistencia del endometrio a la lisis por parte de las células NK, esto era cierto para el componente estromal pero no para el epitelial, atribuyendo al estroma el inicio de la endometriosis. Sin embargo en un trabajo de Dmowski et al. observaron menos apoptosis en el componente glandular del endometrio de mujeres afectas comparado con mujeres sanas, cosa que no sucedía con el estroma, atribuyendo a las glándulas la capacidad de implantación (Dmowski W. P., Ding J. et al. 2001). Para Nisolle et al. el estroma sería el responsable de la unión al sitio de implantación extrauterina y las glándulas del crecimiento posterior (Nisolle M., Casanas-Roux F. et al. 2000). En nuestro caso la alteración de $\alpha6\beta4$ se producía sólo en las glándulas por ser esta su localización normal: esta parte de nuestro trabajo apoyaría por tanto la idea que las glándulas podrían tener también un papel importante en la génesis de la endometriosis.

6.5. LA EXPRESIÓN DE HLA I

La detección de una expresión significativamente más elevada de HLA I tanto en glándulas (U de Mann-Whitney 115, $p=0.043$) como en estroma (U de Mann-Whitney 83.5, $p=0.003$) en endometrio de mujeres del grupo Endometriosis en comparación a mujeres del grupo Control, considerando todas las muestras globalmente, era un resultado que cuadraba muy bien con nuestra hipótesis: una expresión más elevada de HLA I en el endometrio de mujeres afectas de endometriosis significaría una mayor capacidad de mantener la actividad citolítica de las células NK inhibida.

No deja de ser sorprendente el hecho de que existen escasas referencias bibliográficas sobre expresión de HLA I en endometrio, ya sea de mujeres sanas o de mujeres con endometriosis. Dado que la expresión de HLA I en las células susceptibles de convertirse en dianas para las células NK es determinante para mantener estas células NK inhibidas, establecerla parecería obligado en un estudio de esta índole.

Sin embargo cuando uno revisa la literatura halla un corto número de trabajos sobre el tema. Las moléculas HLA I tipo I se expresan en todas las células nucleadas del organismo (Janeway C. A., Travers P. et al. 2003) y por lo tanto obviamente también deberían expresarse en endometrio. Si bien Johnson y Bulmer así lo confirmaron mediante inmunohistoquímica ya en 1984 (Johnson P. M. y Bulmer J. N. 1984) no es hasta 1998 que Komatsu et al. establecieron los cambios de expresión que las moléculas HLA I pueden tener con el ciclo menstrual. Estos autores, mediante determinación de ARN mensajero e inmunohistoquímica en tejido parafinado, en la que la expresión

antigénica que se detecta siempre es más pobre que en tejido congelado, observaron que la expresión de HLA I era débil en glándulas endometriales y se producía sobretodo en fase proliferativa; en estroma disminuía de la fase proliferativa a la fase secretora inicial para llegar a la máxima intensidad de expresión en la fase secretora tardía y al inicio de la gestación. La expresión de HLA I era intensa también en endometrio de pacientes tratadas con estrógenos y gestágenos (anticonceptivos). En cultivos de células del estroma endometrial se inducía la expresión añadiendo progesterona al medio (Komatsu T., Konishi I. et al. 1998).

Respecto a la expresión de la molécula HLA I en general o de alguno de sus subtipos en mujeres afectas de endometriosis, tampoco existen muchas referencias en la bibliografía. Se resumen las publicaciones halladas a continuación:

- En un trabajo de Semino et al. (Semino C., Semino A. et al. 1995) se demostraba que las células endometriales en cultivo presentaban al inicio una alta expresión de moléculas HLA I en superficie, expresión que se perdía al mantener las células en cultivo al tiempo que se incrementaba la susceptibilidad a la lisis por parte de las células NK. La resistencia a la lisis se recuperaba al tratar el cultivo con γ -interferón. Se demostraba que la lisis dependía de las células NK y de los linfocitos T *NK-like*. Tratando el cultivo de células endometriales que expresaba intensamente HLA I con anticuerpos monoclonales contra HLA-B7, un subtipo de molécula HLA I clásica, se perdía la resistencia a la citolisis, por lo que sugerían un papel determinante de este subtipo HLA en la génesis de la endometriosis. Finalmente determinaban en este trabajo la expresión de HLA I en tejido endometriósico mediante inmunofluorescencia, observando una baja expresión en dos muestras analizadas el día 10 del ciclo y alta expresión en dos muestras que correspondían al día 20 del

ciclo: este resultado sería coherente con la publicación posterior de Komatsu et al. (Komatsu T., Konishi I. et al. 1998), en el que la expresión de HLA I aumentaba estimulando la célula con estrógenos y progesterona. En todo caso, en este trabajo de Semino et al no aparecían comparaciones en la expresión de HLA I entre endometrio de mujeres sanas y endometrio de mujeres con endometriosis: los estudios en endometrio se hacían cultivando células endometriales.

- Xin et al. también demostraron en células endometriales en cultivo que el γ -interferon incrementaba la expresión de HLA I y con ello la resistencia a la lisis por parte de las células NK, sugiriendo un papel de la expresión de HLA I en la génesis de la endometriosis (Xin Y., Xu X. et al. 2000).
- Hornung et al. estudiaron en endometrio y tejido endometriósico la molécula HLA-G, un subtipo de molécula HLA-I no clásica, expresada en trofoblasto y que parece tener un papel fundamental en la inmunotolerancia materna al embrión. No se observó expresión de HLA-G en endometrio de pacientes endometriósicas, ni en endometrio de controles, ni en tejido endometriósico: según este resultado no puede atribuirse a esta molécula la especial resistencia del endometrio de mujeres con endometriosis a la lisis por células NK.

No hemos hallado en la literatura otros trabajos que, como el nuestro, comparen la expresión en endometrio de HLA-I en general o de alguno de sus subtipos entre mujeres con y sin endometriosis.

Komatsu et al. evidenciaron que la expresión de HLA-I varía con el ciclo endometrial (Komatsu T., Konishi I. et al. 1998). Al comparar los dos grupos en cuanto

a fase del ciclo, tomando sólo aquellas muestras en las que se había conseguido determinar HLA I, si bien existía un mayor porcentaje de muestras en fase secretora en el grupo Control, esta diferencia no llegaba a ser significativa, al contrario de lo que ocurría en el estudio de la integrina $\alpha 6\beta 4$. Por lo tanto las diferencias de expresión entre grupo Control y grupo Endometriosis se podrían atribuir a la endometriosis y no a la diferencia en la fase del ciclo menstrual. De todas formas, conscientes de que, aunque sin diferencias significativas, existía un porcentaje de muestras en fase secretora mayor en el grupo Control, y de que la expresión molecular en general y de HLA I en concreto puede variar a lo largo del ciclo menstrual, nos planteamos como objetivo secundario de la tesis comparar la expresión en las distintas fase del ciclo. Así pudimos observar que en fase proliferativa, si bien la mediana en la expresión de HLA I era superior en el grupo Endometriosis respecto al grupo Control, tanto en glándulas (100% vs 90%) como en estroma (20% vs 10%), la diferencia no era estadísticamente significativa. Comparando las muestras en fase secretora, la expresión de HLA I era superior en el grupo endometriosis tanto en glándulas (mediana 100% vs 70%) como en estroma (mediana 80% vs 20%) pero la diferencia sólo era estadísticamente significativa para el estroma. Exactamente lo mismo sucedía al considerar sólo las muestras en fase secretora tardía (expresión superior de HLA I tanto en glándulas como en estroma pero estadísticamente significativa sólo en estroma). La pérdida de significación estadística para glándulas y estroma en fase proliferativa, así como en glándulas en fase secretora podría atribuirse a la baja potencia estadística por el escaso número de muestras, pero habría que ampliar el estudio con más casos para esclarecer si las diferencias son significativas ya en fase proliferativa y si existen diferencias en el componente glandular en fase secretora. Las diferencias de expresión de HLA I entre mujeres afectas y no afectas de endometriosis parecen claras en estroma endometrial especialmente en fase

secretora, ya que persisten estadísticamente significativas a pesar del reducido número de casos.

También por la existencia de estos cambios cíclicos, fue un objetivo secundario comparar entre fase proliferativa y fase secretora del el grupo Endometriosis, tal como comentábamos anteriormente. Observamos que la expresión de HLA I en el grupo Endometriosis era prácticamente igual en glándulas tanto en fase proliferativa como en fase secretora (U de Mann-Whitney 75, $p=0.894$). En cambio, la expresión de HLA I en el estroma del grupo Endometriosis era significativamente más elevada en fase secretora que en fase proliferativa (U de Mann-Whitney 30, $p=0.008$). Estos resultados son superponibles a los descritos por Komatsu et al. en endometrio de mujeres no afectas de endometriosis, en los que observaron pocas diferencias en el componente glandular en la expresión de HLA I e incremento de esta expresión en fase secretora en el estroma (Komatsu T., Konishi I. et al. 1998). Se podría concluir con este resultado que el endometrio de mujeres afectas de endometriosis seguiría los mismos cambios fisiológicos en la expresión de HLA I que las mujeres no afectas, aunque con una intensidad en la expresión mayor.

La cuestión que nos plantea el resultado de nuestro estudio es qué podría explicar esta mayor expresión de HLA-I en endometrio de mujeres con endometriosis respecto a controles. En la respuesta del organismo a la infección por virus, el interferon- α e interferon- β producidos por los macrófagos inducen dos efectos fundamentales: aumentan la expresión de HLA-I en las células normales del organismo y activan las células NK. De esta forma las células NK lisarían las células infectadas pero respetarían a las propias células (Jameway C. A., Travers P. et al. 2003). También el

interferon- γ incrementa la expresión de HLA-I en células normales (Janeway C. A., Travers P. et al. 2003) y en el endometrio (Semino C., Semino A. et al. 1995; Xin Y., Xu X. et al. 2000). El *Tumor Necrosis Factor* (TNF) es otro factor que incrementa la expresión de HLA I (Janeway C. A., Travers P. et al. 2003). Como ya mencionábamos en la introducción, varios trabajos hallan mayor producción de citocinas en líquido peritoneal de mujeres afectas de endometriosis en comparación a líquido peritoneal de mujeres no afectas así como en implante endometriósico al comparar con endometrio eutópico, incluyendo TNF (Klein N. A., Pergola G. M. et al. 1993; Witz C. A., Montoya I. A. et al. 1994; McLaren J., Prentice A. et al. 1996; Witz C. A. 2000), pero las diferencias al comparar el endometrio de pacientes y controles se han descrito para la IL-1 e IL-6, pero no para los factores que estimulan la expresión de HLA I (Sharpe-Timms K. L. 2001).

También la progesterona aumenta la expresión de HLA I en células endometriales (Komatsu T., Konishi I. et al. 1998) al tiempo que incrementa la presencia de células NK en endometrio (King A., Burrows T. et al. 1998), de un modo parecido a lo que sucede con los interferones y la infección. Cabría investigar la relación entre el aumento de aromatasa descrito por Kitawaki et al en endometrio eutópico de mujeres afectas de endometriosis (Kitawaki J., Kusuki I. et al. 1999; Kitawaki J., Kado N. et al. 2002), ya que supone un incremento de estrógenos localmente y la síntesis del receptor de progesterona depende directamente de la presencia de estrógenos (Speroff L, Glass R.H. et al. 1999). De todas formas hasta la fecha no se ha podido demostrar una expresión distinta de receptores para la progesterona en endometrio de mujeres con endometriosis al compararlo con endometrio de mujeres no afectas (Sharpe-Timms K. L. 2001). Aún así, dado que la producción de citocinas en el endometrio tiene una

regulación hormonal (Rier S. E. y Yeaman G. R. 1997; Dunn C. L., Critchley H. O. et al. 2002) podría ser objeto de un futuro estudio la relación entre presencia de aromatasa en endometrio de mujeres afectas de endometriosis, producción local de estrógenos y progesterona, producción de citocinas y expresión de HLA I en la célula.

Una consecuencia que se podría desprender de nuestros resultados es la siguiente: el endometrio de mujeres afectas de endometriosis expresa HLA I en más cantidad que el endometrio de mujeres no afectas y por tanto es resistente a la lisis. Se deduciría pues que el endometrio de mujeres sanas, con una expresión significativamente inferior, es susceptible a la lisis por células NK y esto evitaría su implantación y que estas mujeres desarrollaran endometriosis. ¿Por qué no lisan las células NK a las células endometriales ya en cavidad uterina? Se ha sugerido que los estrógenos inhibirían la función de las células NK (Garzetti G. G., Ciavattini A. et al. 1993; Di Stefano G., Provinciali M. et al. 1994; Albrecht A. E., Hartmann B. W. et al. 1996; Ben-Eliyahu S., Shakhar G. et al. 2000): se podría hipotetizar que durante el ciclo menstrual las células NK infiltrarían progresivamente el endometrio (King A., Burrows T. et al. 1998) sin ser capaces de ejercer su función citolítica sobre células teóricamente susceptibles, al hallarse inhibidas por hormonas. Al no producirse gestación y con la caída de los niveles hormonales, se iniciaría su activación y lisarían las células endometriales susceptibles. De hecho King et al. sugieren que un posible papel de las células NK al infiltrar el endometrio durante el ciclo menstrual sería regular el crecimiento y necrosis de este epitelio (King A., Burrows T. et al. 1998). Nuevos estudios deben realizarse para confirmar o desmentir estas hipótesis.

Por último queremos comentar que la alteración hallada en nuestro estudio en la expresión de HLA I afecta tanto a componente glandular como a componente estromal cuando consideramos el endometrio globalmente y afecta sobretodo a componente estromal cuando el análisis se realiza sólo en fase secretora. Tal como discutíamos para el resultado de $\alpha6\beta4$, existen autores que hipotetizan un mayor papel del estroma en iniciar la endometriosis mientras otros defienden un papel importante también para las glándulas. Los resultados de nuestro estudio en la expresión de HLA I sugerirían inicialmente que tanto el componente estromal como el glandular intervendrían en la génesis de la endometriosis, en la línea defendida por Nisolle et al (Nisolle M., Casanas-Roux F. et al. 2000), pero que tal vez el papel del estroma pudiera ser preponderante, en tanto que las diferencias se detectan aún con una bajo número de casos.

6.6.LA CONCORDANCIA ENTRE LAS ALTERACIONES

Una vez observadas diferencias significativas en la expresión de $\alpha\beta 4$ en glándulas, en la expresión de HLA-I en las glándulas y en la expresión de HLA I en estroma, como objetivo secundario nos planteamos estudiar si estas diferencias se asociaban entre ellas o no. En el caso de HLA-I, las glándulas y el estroma fueron consideradas por separado en tanto que la expresión entre estos dos componentes endometriales no era siempre coincidente, tal como ya habían observado Komatsu et al en su trabajo (Komatsu T., Konishi I. et al. 1998).

El motivo para establecer si estas alteraciones observadas coincidían en las mujeres afectas era intentar determinar si varias alteraciones moleculares deberían producirse para iniciar la endometriosis, o si bien estas alteraciones observadas pueden existir por separado en distintos casos, lo cual sugeriría varias vías etiopatogénicas para un resultado clínico similar.

Quedaba claro en el caso de $\alpha\beta 4$ que la alteración era la expresión no polarizada, ya que la expresión basal era la más frecuente en el grupo Control. Para el HLA-I, tomamos como anómalos aquellos valores que producían menos “falsos negativos” y menos “falsos positivos” si la sobreexpresión se hubiera tomado como un test diagnóstico para clasificar entre paciente afecta o no afecta de endometriosis: estos

valores correspondían a expresión en el 100% de células en cuanto a expresión glandular y a más del 20% de células en la expresión estromal.

Al aplicar un test de Kappa para determinar la correlación entre las alteraciones tal como las habíamos definido, se observó en primer lugar que, efectivamente, no existía correlación entre glándulas y estroma endometrial en la sobreexpresión de HLA I. Tampoco existía correlación alguna entre la sobreexpresión de HLA-I en glándulas y estroma y la alteración en la expresión de $\alpha 6\beta 4$. De ello se deduciría pues que las pacientes afectas de endometriosis podrían presentar alteraciones en distintas moléculas, sugiriéndonos varias vías etiopatogénicas para un resultado clínico similar, en la línea que defendía C.A. Winkel en su trabajo (Winkel C. A. 1999).

A continuación quisimos determinar cuántas pacientes de cada grupo presentaban ninguna, una, dos o tres de las alteraciones que habíamos descrito. El resultado fue muy interesante: ninguna paciente sana presentaba las tres alteraciones descritas y todas las pacientes afectas de endometriosis presentaban alguna de las tres alteraciones, siendo la diferencia entre las que presentaban cero, una dos o tres alteraciones estadísticamente significativa entre ambos grupos (20% de pacientes del grupo Control presentaban 2 o 3 “alteraciones”, 72.8% en el grupo Endometriosis). Este resultado nos sugeriría por un lado que una paciente no afecta de endometriosis puede presentar alguna de estas alteraciones observadas, pero que si presentara las tres alteraciones acabaría desarrollando la enfermedad. Por otro lado nos sugeriría que en determinadas pacientes la endometriosis se inicia con una, en otras con dos y en otras

con las tres “alteraciones” observadas, pero que el inicio de la endometriosis no se produciría si no concurre al menos una de ellas. En otras palabras, podríamos aventurar que para iniciar una endometriosis se debería presentar al menos una alteración en la expresión de los ligandos para las células NK: el riesgo de desarrollar la enfermedad sería del 100% si concurrieran las tres alteraciones observadas.

7. CONCLUSIONES

- 1- El endometrio expresa **LFA-3** en células endoteliales, en células glandulares y en el 20% del estroma. Mediante inmunohistoquímica no se detectan diferencias entre pacientes afectas y no afectas de endometriosis en la expresión de LFA-3 en el componente glandular, ni en el estromal, ni en endotelio.

- 2- La expresión de **ICAM 1** en glándulas y estroma endometrial resulta prácticamente negativa con la técnica y el anticuerpo monoclonal utilizado en este trabajo, por lo que no parece una técnica adecuada para realizar comparaciones entre pacientes afectas y no afectas de endometriosis.

- 3- El endometrio expresa integrina **$\alpha 6\beta 4$** en el endotelio y en las glándulas, existiendo en éstas dos patrones de expresión: polarizado en la zona basal o en toda la superficie celular (despolarizado). Un porcentaje significativamente más elevado de pacientes afectas de endometriosis presenta expresión despolarizada de $\alpha 6\beta 4$ al comparar con la expresión en pacientes no afectas. Dado que la despolarización se ha relacionado con pérdida de función de esta molécula, ello significaría que el endometrio de mujeres afectas de endometriosis se uniría con más dificultad a las células NK al estar la integrina **$\alpha 6\beta 4$** alterada.

4- El endometrio expresa **HLA I** de forma variable en células glandulares y estroma. El componente glandular de pacientes afectas de endometriosis presenta una expresión de HLA-I significativamente mayor que el de las pacientes no afectas, comparando muestras en ambas fase del ciclo menstrual conjuntamente, pero la diferencia no es evidente al comparar por separado muestras en fase proliferativa y muestras en fase secretora. El componente estromal de pacientes afectas de endometriosis presenta una expresión significativamente mayor de HLA-I que el de pacientes no afectas, tanto al comparar muestras que se hallan indistintamente en ambas fases del ciclo como al comparar muestras en fase secretora. Esta expresión aumentada de HLA I en endometrio de mujeres afectas de endometriosis parece seguir las fluctuaciones fisiológicas que se han descrito en la expresión de HLA I en endometrio de mujeres no afectas, con incremento de esta expresión en fase secretora respecto a la fase proliferativa. Esta expresión aumentada de HLA I en endometrio de mujeres afectas de endometriosis explicaría una mayor resistencia a la lisis NK, al tener mayor capacidad para ocupar los receptores inhibidores de estas células (KIR).

5- Si tomamos como alteradas una expresión despolarizada de $\alpha6\beta4$ en glándulas endometriales, una expresión de HLA I en glándulas endometriales del 100% y una expresión en estroma endometrial superior al 20%, observamos que las tres alteraciones no coinciden en todas las pacientes, lo cual parecería apoyar la idea

de que distintas alteraciones moleculares estarían implicadas en la génesis de la enfermedad. Observamos también que ninguna paciente no afecta presenta las tres alteraciones a la vez, lo cual nos sugeriría que el acúmulo de varias alteraciones en la expresión de ligandos para las células NK supondría el desarrollo inevitable de una endometriosis. Además, en todas las pacientes afectas de endometriosis existe alguna de las tres alteraciones, lo cual nos sugeriría que para que se presente la endometriosis debería existir al menos una alteración en la expresión endometrial de los ligandos para las células NK.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acien P., Quereda F., Campos A., Gomez-Torres M. J., Velasco I. y Gutierrez M. (2002). "Use of intraperitoneal interferon alpha-2b therapy after conservative surgery for endometriosis and postoperative medical treatment with depot gonadotropin-releasing hormone analog: a randomized clinical trial." *Fertil Steril* **78**(4): 705-11.

Albrecht A. E., Hartmann B. W., Scholten C., Huber J. C., Kalinowska W. y Zielinski C. C. (1996). "Effect of estrogen replacement therapy on natural killer cell activity in postmenopausal women." *Maturitas* **25**(3): 217-22.

Alcazar J. L., Laparte C., Jurado M. y Lopez-Garcia G. (1997). "The role of transvaginal ultrasonography combined with color velocity imaging and pulsed Doppler in the diagnosis of endometrioma." *Fertil Steril* **67**(3): 487-91.

Ali A. F., Fateen B., Ezzet A., Badawy H., Ramadan A. y El-tobge A. (2000). "Laparoscopic intraperitoneal injection of human interferon-alpha2b in the treatment of pelvic endometriosis: a new modality." *Obstet Gynecol* **95**(4 Suppl 1): S47-S48.

American-Fertility-Society (1985). "Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985." *Fertil Steril* **43**(3): 351-2.

Arici A., Oral E., Attar E., Tazuke S. I. y Olive D. L. (1997). "Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells." *Fertil Steril* **67**(6): 1065-72.

Arimoto T., Katagiri T., Oda K., Tsunoda T., Yasugi T., Osuga Y., Yoshikawa H., Nishii O., Yano T., Taketani Y. y Nakamura Y. (2003). "Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis." *Int J Oncol* **22**(3): 551-60.

Arrive L., Hricak H. y Martin M. C. (1989). "Pelvic endometriosis: MR imaging." *Radiology* **171**(3): 687-92.

Barber D. F. y Long E. O. (2003). "Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells." *J Immunol* **170**(1): 294-9.

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J. H., Lanier L. L. y Spies T. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* **285**(5428): 727-9.

Bednoff S. L. y Garfinkle B. M. (1965). "Endometriosis of the pleura." *Obstet Gynecol* **26**(4): 549-51.

Ben-Eliyahu S., Shakhar G., Shakhar K. y Melamed R. (2000). "Timing within the oestrous cycle modulates adrenergic suppression of NK activity and resistance to metastasis: possible clinical implications." *Br J Cancer* **83**(12): 1747-54.

Bergqvist A. (1992). "Extragenital endometriosis. A review." *Eur J Surg* **158**(1): 7-12.

Bergqvist A., Ljungberg O. y Myhre E. (1984). "Human endometrium and endometriotic tissue obtained simultaneously: a comparative histological study." *Int J Gynecol Pathol* **3**(2): 135-45.

Bergqvist A., Ljungberg O. y Skoog L. (1993). "Immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium." *Hum Reprod* **8**(11): 1915-22.

Bhojwala J., Heller D. S., Cracchiolo B. y Sama J. (2000). "Endometriosis presenting as bloody pleural effusion and ascites-report of a case and review of the literature." *Arch Gynecol Obstet* **264**(1): 39-41.

Brackin M. N., Cruse J. M., Lewis R. E., Hines R. S., Stoppie J. A. y Cowan B. D. (2002). "Quantitative analysis of adhesion molecules on cellular constituents of the human uterine microenvironment under the influence of estrogen and progesterone." *Exp Mol Pathol* **72**(2): 91-114.

Braun D. P. y Dmowski W. P. (1998). "Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response." *Curr Opin Obstet Gynecol* **10**(5): 365-9.

Brenner C. y Wohlgemuth S. (1990). "Scar endometriosis." *Surg Gynecol Obstet* **170**(6): 538-40.

Bridges J. E., Prentice A., Roche W., Englefield P. y Thomas E. J. (1994). "Expression of integrin adhesion molecules in endometrium and endometriosis." *Br J Obstet Gynaecol* **101**(8): 696-700.

Burns W. N. y Schenken R. S. (1999). "Pathophysiology of endometriosis-associated infertility." *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 586-610.

Byrd W., Bradshaw K., Carr B., Edman C., Odom J. y Ackerman G. (1990). "A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor sperm." *Fertil Steril* **53**(3): 521-7.

Chung J., Bachelder R. E., Lipscomb E. A., Shaw L. M. y Mercurio A. M. (2002). "Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells." *J Cell Biol* **158**(1): 165-74.

Clement P. B. (2002). Diseases of the peritoneum. *Blaunstein's Pathology of the female genital tract.* R. J. Kurman. New York, Springer-Verlog, **1**: 747-789.

Cramer D. W. y Missmer S. A. (2002). "The epidemiology of endometriosis." *Ann N Y Acad Sci* **955**: 11-22; discussion 34-6, 396-406.

Cramer D. W., Wilson E., Stillman R. J., Berger M. J., Belisle S., Schiff I., Albrecht B., Gibson M., Stadel B. V. y Schoenbaum S. C. (1986). "The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise." *Jama* **255**(14): 1904-8.

Darrow S. L., Selman S., Batt R. E., Zielezny M. A. y Vena J. E. (1994). "Sexual activity, contraception, and reproductive factors in predicting endometriosis." *Am J Epidemiol* **140**(6): 500-9.

Darrow S. L., Vena J. E., Batt R. E., Zielezny M. A., Michalek A. M. y Selman S. (1993). "Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis." *Epidemiology* **4**(2): 135-42.

De Luca M., Pellegrini G., Zambruno G. y Marchisio P. C. (1994). "Role of integrins in cell adhesion and polarity in normal keratinocytes and human skin pathologies." *J Dermatol* **21**(11): 821-8.

Demco L. (1998). "Mapping the source and character of pain due to endometriosis by patient-assisted laparoscopy." *J Am Assoc Gynecol Laparosc* **5**(3): 241-5.

D'Hooghe T. M., Bambra C. S., Raeymaekers B. M., De Jonge I., Lauweryns J. M. y Koninckx P. R. (1995). "Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*)." *Am J Obstet Gynecol* **173**(1): 125-34.

D'Hooghe T. M., Scheerlinck J. P., Koninckx P. R., Hill J. A. y Bambra C. S. (1995). "Anti-endometrial lymphocytotoxicity and natural killer cell activity in baboons (*Papio anubis* and *Papio cynocephalus*) with endometriosis." *Hum Reprod* **10**(3): 558-62.

Di Stefano G., Provinciali M., Muzzioli M., Garzetti G. G., Ciavattini A. y Fabris N. (1994). "Correlation between estradiol serum levels and NK cell activity in endometriosis." *Ann N Y Acad Sci* **741**(1): 197-203.

Dmowski W. P., Ding J., Shen J., Rana N., Fernandez B. B. y Braun D. P. (2001). "Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis." *Hum Reprod* **16**(9): 1802-8.

Dmowski W. P., Gebel H. M. y Braun D. P. (1994). "The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis." *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* **159**: 7-14.

Dmowski W. P., Steele R. W. y Baker G. F. (1981). "Deficient cellular immunity in endometriosis." *Am J Obstet Gynecol* **141**(4): 377-83.

Dokras A. y Olive D. L. (1999). "Endometriosis and assisted reproductive technologies." *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 687-98.

Duke R., Fawcett P. y Booth J. (1995). "Recurrent subarachnoid hemorrhage due to endometriosis." *Neurology* **45**(5): 1000-2.

Dunn C. L., Critchley H. O. y Kelly R. W. (2002). "IL-15 regulation in human endometrial stromal cells." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(4): 1898-901.

Egarter C., Krestan C. y Kurz C. (1996). "Abdominal dissemination of malignant cells with hysteroscopy." *Gynecol Oncol* **63**(1): 143-4.

Elliot D. L., Barker A. F. y Dixon L. M. (1985). "Catamenial hemoptysis. New methods of diagnosis and therapy." *Chest* **87**(5): 687-8.

Eskenazi B. y Warner M. L. (1997). "Epidemiology of endometriosis." *Obstet Gynecol Clin North Am* **24**(2): 235-58.

Evers J. L., Land J. A., Dunselman G. A., van der Linden P. J. y Hamilton J. C. (1998). "'The Flemish Giant', reflections on the defense against endometriosis, inspired by Professor Emeritus Ivo A. Brosens." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **81**(2): 253-8.

Fedele L., Bianchi S., Bocciolone L., Di Nola G. y Franchi D. (1993). "Buserelin acetate in the treatment of pelvic pain associated with minimal and mild endometriosis: a controlled study." *Fertil Steril* **59**(3): 516-21.

Ferrari B. T. y Shollenbarger D. R. (1977). "Abdominal wall endometriosis following hypertonic saline abortion." *J Am Med Assoc* **238**(1): 56-7.

Fletcher J. M., Prentice H. G. y Grundy J. E. (1998). "Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV-induced down-regulation of cell surface class I HLA." *J Immunol* **161**(5): 2365-74.

Foster D. C., Stern J. L., Buscema J., Rock J. A. y Woodruff J. D. (1981). "Pleural and parenchymal pulmonary endometriosis." *Obstet Gynecol* **58**(5): 552-6.

Friedman H., Vogelzang R. L., Mendelson E. B., Neiman H. L. y Cohen M. (1985). "Endometriosis detection by US with laparoscopic correlation." *Radiology* **157**(1): 217-20.

Fukaya T., Sugawara J., Yoshida H., Murakami T. y Yajima A. (1999). "Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: original investigation and a review of literature." *Gynecol Obstet Invest* **47 Suppl 1**: 11-6; discussion 16-7.

Garcia-Penarrubia P., Lorenzo N., Galvez J., Campos A., Ferez X. y Rubio G. (2002). "Study of the physical meaning of the binding parameters involved in effector-target conjugation using monoclonal antibodies against adhesion molecules and cholera toxin." *Cell Immunol* **215**(2): 141-50.

Garzetti G. G., Ciavattini A., Provinciali M., Fabris N., Cignitti M. y Romanini C. (1993). "Natural killer cell activity in endometriosis: correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity." *Obstet Gynecol* **81**(5 (Pt 1)): 665-8.

Garzetti G. G., Ciavattini A., Provinciali M., Muzzioli M., Di Stefano G. y Fabris N. (1995). "Natural killer activity in stage III and IV endometriosis: impaired cytotoxicity and retained lymphokine responsiveness of natural killer cells." *Gynecol Endocrinol* **9**(2): 125-30.

Garzetti G. G., Ciavattini A., Provinciali M., Muzzioli M., Di Stefano G. y Fabris N. (1996). "Natural cytotoxicity and GnRH agonist administration in advanced endometriosis: positive modulation on natural killer activity." *Obstet Gynecol* **88**(2): 234-40.

Gerlinzani S., Tos M., Poliziani D., Rossi R. y Taschieri A. M. (2002). "Cathamerial pneumothorax." *Surg Endosc* **16**(5): 870-1.

Gitlits V. M., Toh B. H. y SENTRY J. W. (2001). "Disease association, origin, and clinical relevance of autoantibodies to the glycolytic enzyme enolase." *J Investig Med* **49**(2): 138-45.

Goumenou A. G., Vassiliadis S., Matalliotakis I. M., Koumantakis E. G., Lembessis P. y Koutsilieris M. (2003). "Mutation analysis of BrCA1, BrCA2, and p53 versus soluble HLA class I and class II in a case of familial endometriosis." *Fertil Steril* **79**(2): 445-8.

Granberg I. y Willems J. S. (1977). "Endometriosis of lung and pleura diagnosed by aspiration biopsy." *Acta Cytol* **21**(2): 295-7.

Grodstein F., Goldman M. B. y Cramer D. W. (1994). "Infertility in women and moderate alcohol use." *Am J Public Health* **84**(9): 1429-32.

Grodstein F., Goldman M. B., Ryan L. y Cramer D. W. (1993). "Relation of female infertility to consumption of caffeinated beverages." *Am J Epidemiol* **137**(12): 1353-60.

Groll M. (1984). "Endometriosis and spontaneous abortion." *Fertil Steril* **41**(6): 933-5.

Gruppo-Italiano-per-lo-Studio-dell'-Endometriosi (1994). "Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi." *Hum Reprod* **9**(6): 1158-62.

Gupta R. K., Green C. y Wood K. P. (2000). "Fine needle aspiration cytodiagnosis of endometriosis in an abdominal scar after caesarean section [letter]." *Cytopathology* **11**(1): 67-8.

Hadfield R. M., Mardon H. J., Barlow D. H. y Kennedy S. H. (1997). "Endometriosis in monozygotic twins." *Fertil Steril* **68**(5): 941-2.

Halban J. (1924). "Metastasic hysteroadenomyosis." *Wien Klin Wochenschr* **37**: 1205-1206.

Halme J., Hammond M. G., Hulka J. F., Raj S. G. y Talbert L. M. (1984). "Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis." *Obstet Gynecol* **64**(2): 151-4.

Halme J., White C., Kauma S., Estes J. y Haskill S. (1988). "Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* **66**(5): 1044-9.

Hammond M. G., Oh S. T., Anners J., Surrey E. S. y Halme J. (1993). "The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture." *Am J Obstet Gynecol* **168**(4): 1131-6; discussion 1136-8.

Haney A. F., Jenkins S. y Weinberg J. B. (1991). "The stimulus responsible for the peritoneal fluid inflammation observed in infertile women with endometriosis." *Fertil Steril* **56**(3): 408-13.

Harada T., Yoshioka H., Yoshida S., Iwabe T., Onohara Y., Tanikawa M. y Terakawa N. (1997). "Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis." *Am J Obstet Gynecol* **176**(3): 593-7.

Healy J. T., Wilkinson N. W. y Sawyer M. (1995). "Abdominal wall endometrioma in a laparoscopic trocar tract: a case report." *Am Surg* **61**(11): 962-3.

Hemmings R. (1998). "Combined treatment of endometriosis. GnRH agonists and laparoscopic surgery." *J Reprod Med* **43**(3 Suppl): 316-20.

Hill J. A., Faris H. M., Schiff I. y Anderson D. J. (1988). "Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis." *Fertil Steril* **50**(2): 216-22.

Hitti I. F., Glasberg S. S. y Lubicz S. (1990). "Clear cell carcinoma arising in extraovarian endometriosis: report of three cases and review of the literature." *Gynecol Oncol* **39**(3): 314-20.

Ho H. N., Wu M. Y. y Yang Y. S. (1997). "Peritoneal cellular immunity and endometriosis." *Am J Reprod Immunol* **38**(6): 400-12.

Hobbs J. E. y Bortnick A. R. (1940). "Endometriosis of the lungs: experimental and clinical study." *Am J Obstet Gynecol.* **40**: 832-843.

Hogg N. y Bates P. A. (2000). "Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes." *Matrix Biol* **19**(3): 211-22.

Hoglund P., Ohlen C., Carbone E., Franksson L., Ljunggren H. G., Latour A., Koller B. y Karre K. (1991). "Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10332-6.

Hong Y. J., Paik H. C., Kim H. J., Lee D. Y., Kim S. J., Cho S. H. y Oh Y. M. (1999). "A case of parenchymal pulmonary endometriosis." *Yonsei Med J* **40**(5): 514-7.

Honore G. M. (1999). "Extrapelvic endometriosis." *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 699-711.

Hornung D., Fujii E., Lim K. H., Vigne J. L., McMaster M. T. y Taylor R. N. (2001). "Histocompatibility leukocyte antigen-G is not expressed by endometriosis or endometrial tissue." *Fertil Steril* **75**(4): 814-7.

Houston D. E., Noller K. L., Melton L. J., 3rd, Selwyn B. J. y Hardy R. J. (1987). "Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1979." *Am J Epidemiol* **125**(6): 959-69.

Hsu C. C., Lin Y. S., Wang S. T. y Huang K. E. (1997). "Immunomodulation in women with endometriosis receiving GnRH agonist." *Obstet Gynecol* **89**(6): 993-8.

Hsu C. C., Yang B. C., Wu M. H. y Huang K. E. (1997). "Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis." *Fertil Steril* **67**(6): 1059-64.

Hughes E., Fedorkow D., Collins J. y Vandekerckhove P. (2000). "Ovulation suppression for endometriosis." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD000155.

Hughes M. L., Bartholomew D. y Paluzzi M. (1997). "Abdominal wall endometriosis after amniocentesis. A case report." *J Reprod Med* **42**(9): 597-9.

Hurd W. W. (1998). "Criteria that indicate endometriosis is the cause of chronic pelvic pain [see comments]." *Obstet Gynecol* **92**(6): 1029-32.

Iborra A., Palacio J. R., Ulcova-Gallova Z. y Martinez P. (2000). "Autoimmune response in women with endometriosis." *Am J Reprod Immunol* **44**(4): 236-41.

Ichida M., Gomi A., Hiranouchi N., Fujimoto K., Suzuki K., Yoshida M., Nokubi M. y Masuzawa T. (1993). "A case of cerebral endometriosis causing catamenial epilepsy." *Neurology* **43**(12): 2708-9.

Isacke C. M. y Horton M. A. (2000). *The adhesion molecule facts book*. London, Harcourt Brace&Company, Publishers.

Iwasaki K., Makino T., Maruyama T., Matsubayashi H., Nozawa S. y Yokokura T. (1993). "Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis." *Int J Fertil Menopausal Stud* **38**(4): 229-34.

Jameway C. A., Travers P., Walport M. y Shlomchik M. J. (2003). *Inmunidad innata. Inmunobiología*. G. Publishing. New York, Current Biology Publications-Elsevier Science London: 35-91.

Jameway C. A., Travers P., Walport M. y Shlomchik M. J. (2003). *El complejo mayor de histocompatibilidad y sus funciones. Inmunobiología*. Barcelona, Masson, S.A.: 167-184.

Jansen R. P. (1986). "Minimal endometriosis and reduced fecundability: prospective evidence from an artificial insemination by donor program." *Fertil Steril* **46**(1): 141-3.

Jansen R. P. y Russell P. (1986). "Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition." *Am J Obstet Gynecol* **155**(6): 1154-9.

Javert C. (1952). "The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note of coexisting vascular involvement." *Am J Obstet Gynecol* **64**: 780-806.

Javert C. T. (1949). "Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis. Including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes." *Cancer*. **8**: 399-410.

Jenkins S., Olive D. L. y Haney A. F. (1986). "Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution." *Obstet Gynecol* **67**(3): 335-8.

Johnson P. M. y Bulmer J. N. (1984). "Uterine gland epithelium in human pregnancy often lacks detectable maternal MHC antigens but does express fetal trophoblast antigens." *J Immunol* **132**(4): 1608-10.

Jones K. D., Owen E., Berresford A. y Sutton C. (2002). "Endometrial adenocarcinoma arising from endometriosis of the rectosigmoid colon." *Gynecol Oncol* **86**(2): 220-2.

Jones R. K., Bulmer J. N. y Searle R. F. (1998). "Phenotypic and functional studies of leukocytes in human endometrium and endometriosis." *Hum Reprod Update* **4**(5): 702-9.

Jubanyik K. J. y Comite F. (1997). "Extrapelvic endometriosis." *Obstet Gynecol Clin North Am* **24**(2): 411-40.

Kafkasli A., Franklin R. R. y Sauls D. (1996). "Endometriosis in the uterine wall cesarean section scar." *Gynecol Obstet Invest* **42**(3): 211-3.

Kaunitz A. y Di Sant'Agnese P. A. (1979). "Needle tract endometriosis: an unusual complication of amniocentesis." *Obstet Gynecol* **54**(6): 753-5.

Keenan J. A., Williams-Boyce P. K., Massey P. J., Chen T. T., Caudle M. R. y Bukovsky A. (1999). "Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole." *Fertil Steril* **72**(1): 135-41.

Kettel W. y Stein R. (1951). "The viability of the cast-off menstrual endometrium." *Am J Obstet Gynecol* **61**: 440-42.

Khorram O., Taylor R. N., Ryan I. P., Schall T. J. y Landers D. V. (1993). "Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis." *Am J Obstet Gynecol* **169**(6): 1545-9.

Kilpatrick D. C., Haining R. E. y Smith S. S. (1991). "Are cardiolipin antibody levels elevated in endometriosis?" *Fertil Steril* **55**(2): 436-7.

Kim A. H. y Adamson G. D. (1999). "Surgical treatment options for endometriosis." *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 633-44.

King A., Burrows T., Verma S., Hiby S. y Loke Y. W. (1998). "Human uterine lymphocytes." *Hum Reprod Update* **4**(5): 480-5.

Kitawaki J., Kado N., Ishihara H., Koshihara H., Kitaoka Y. y Honjo H. (2002). "Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease." *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**(1-5): 149-55.

Kitawaki J., Kusuki I., Koshihara H., Tsukamoto K., Fushiki S. y Honjo H. (1999). "Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis." *Fertil Steril* **72**(6): 1100-6.

Kitawaki J., Obayashi H., Kado N., Ishihara H., Koshihara H., Maruya E., Saji H., Ohta M., Hasegawa G., Nakamura N., Yoshikawa T. y Honjo H. (2002). "Association of HLA class I and class II alleles with susceptibility to endometriosis." *Hum Immunol* **63**(11): 1033-8.

Kjerulff K. H., Erickson B. A. y Langenberg P. W. (1996). "Chronic gynecological conditions reported by US women: findings from the National Health Interview Survey, 1984 to 1992." *Am J Public Health* **86**(2): 195-9.

Klein N. A., Pergola G. M., Rao-Tekmal R., Dey T. D. y Schenken R. S. (1993). "Enhanced expression of resident leukocyte interferon gamma mRNA in endometriosis." *Am J Reprod Immunol* **30**(2-3): 74-81.

Koger K. E., Shatney C. H., Hodge K. y McClenathan J. H. (1993). "Surgical scar endometrioma." *Surg Gynecol Obstet* **177**(3): 243-6.

Koizumi T., Inagaki H., Takabayashi Y. y Kubo K. (1999). "Successful use of gonadotropin-releasing hormone agonist in a patient with pulmonary endometriosis." *Respiration* **66**(6): 544-6.

Kokorine I., Nisolle M., Donnez J., Eeckhout Y., Courtoy P. J. y Marbaix E. (1997). "Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions." *Fertil Steril* **68**(2): 246-51.

Komatsu T., Konishi I., Mandai M., Mori T., Hiai H. y Fukumoto M. (1998). "Expression of class I human leukocyte antigen (HLA) and beta2-microglobulin is associated with decidualization of human endometrial stromal cells." *Hum Reprod* **13**(8): 2246-51.

Koninckx P. R., Meuleman C., Demeyere S., Lesaffre E. y Cornillie F. J. (1991). "Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain." *Fertil Steril* **55**(4): 759-65.

Koninckx P. R., Meuleman C., Oosterlynck D. y Cornillie F. J. (1996). "Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma CA-125 concentration." *Fertil Steril* **65**(2): 280-7.

Lanier L. L. (1998). "NK cell receptors." *Annu Rev Immunol* **16**: 359-93.

Lanteri E., Pistritto M., Bartoloni G., Cordaro S., Stivala F. y Montoneri C. (1998). "Expression of alpha6 and beta4 integrin subunits on human endometrium throughout the menstrual cycle and during early pregnancy." *Fertil Steril* **69**(1): 37-40.

Ledger W. L. (1999). "Endometriosis and infertility: an integrated approach." *Int J Gynaecol Obstet* **64 Suppl 1**: S33-40.

Lessey B. A. (1998). "Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity." *Hum Reprod* **13 Suppl 3**: 247-58; discussion 259-61.

Lessey B. A., Damjanovich L., Coutifaris C., Castelbaum A., Albelda S. M. y Buck C. A. (1992). "Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle." *J Clin Invest* **90**(1): 188-95.

Lessey B. A. y Young S. L. (1997). "Integrins and other cell adhesion molecules in endometrium and endometriosis." *Semin Reprod Endocrinol* **15**(3): 291-9.

Levander G. y Normann P. (1955). "The pathogenesis of endometriosis. An experimental study." *Acta Obstet Gynecol Scand* **34**: 366-98.

Liang C. C., Liou B., Tsai C. C., Chen T. C. y Soong Y. K. (1998). "Scar endometriosis." *Int Surg* **83**(1): 69-71.

Liu D. T. y Hitchcock A. (1986). "Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology." *Br J Obstet Gynaecol* **93**(8): 859-62.

Ljunggren H. G. y Karre K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." *Immunol Today* **11**(7): 237-44.

Lussier C., Basora N., Bouatrouss Y. y Beaulieu J. F. (2000). "Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa." *Microsc Res Tech* **51**(2): 169-78.

Maeda N., Izumiya C., Oguri H., Kusume T., Yamamoto Y. y Fukaya T. (2002). "Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis." *Fertil Steril* **77**(4): 679-83.

Mai K. T., Yazdi H. M., Perkins D. G. y Parks W. (1998). "Development of endometriosis from embryonic duct remnants." *Hum Pathol* **29**(4): 319-22.

Makhlouf Obermeyer C., Armenian H. K. y Azoury R. (1986). "Endometriosis in Lebanon. A case-control study." *Am J Epidemiol* **124**(5): 762-7.

Marcoux S., Maheux R. y Berube S. (1997). "Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis." *N Engl J Med* **337**(4): 217-22.

Markham S. M., Carpenter S. E. y Rock J. A. (1989). "Extrapelvic endometriosis." *Obstet Gynecol Clin North Am* **16**(1): 193-219.

Martin D. C. (2002). "Research aspects of endometriosis surgery." *Ann N Y Acad Sci* **955**: 353-9; discussion 389-93, 396-406.

Martin D. C. y Ling F. W. (1999). "Endometriosis and pain." *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 664-86.

Martinez-Roman S., Balasch J., Creus M., Fabregues F., Carmona F., Vilella R. y Vanrell J. A. (1997). "Immunological factors in endometriosis-associated reproductive failure: studies in fertile and infertile women with and without endometriosis." *Hum Reprod* **12**(8): 1794-9.

Matalliotakis I., Panidis D., Vlassis G., Vavilis D., Neonaki M. y Koumantakis E. (1996). "PRL, TSH and their response to the TRH test in patients with endometriosis before, during, and after treatment with danazol." *Gynecol Obstet Invest* **42**(3): 183-6.

Matorras R., Rodriguez F., Gutierrez de Teran G., Pijoan J. I., Ramon O. y Rodriguez-Escudero F. J. (1998). "Endometriosis and spontaneous abortion rate: a cohort study in infertile women." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **77**(1): 101-5.

Matorras R., Rodriguez F., Perez C., Pijoan J. I., Neyro J. L. y Rodriguez-Escudero F. J. (1996). "Infertile women with and without endometriosis: a case control study of luteal phase and other infertility conditions." *Acta Obstet Gynecol Scand* **75**(9): 826-31.

Maxwell C., Kilpatrick D. C., Haining R. y Smith S. K. (1989). "No HLA-DR specificity is associated with endometriosis." *Tissue Antigens* **34**(2): 145-7.

McLaren J., Dealtry G., Prentice A., Charnock-Jones D. S. y Smith S. K. (1997). "Decreased levels of the potent regulator of monocyte/macrophage activation, interleukin-13, in the peritoneal fluid of patients with endometriosis." *Hum Reprod* **12**(6): 1307-10.

McLaren J., Prentice A., Charnock-Jones D. S., Sharkey A. M. y Smith S. K. (1997). "Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis." *Hum Reprod* **12**(1): 146-52.

McLaren J., Prentice A., Charnock-Jones D. S. y Smith S. K. (1996). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis." *Hum Reprod* **11**(1): 220-3.

Mercurio A. M., Rabinovitz I. y Shaw L. M. (2001). "The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 541-5.

Merrill J. (1966). "Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters." **94**: 780-90.

Mingari M. C., Vitale C., Cantoni C., Bellomo R., Ponte M., Schiavetti F., Bertone S., Moretta A. y Moretta L. (1997). "Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor." *Eur J Immunol* **27**(6): 1374-80.

Mio Y., Toda T., Harada T. y Terakawa N. (1992). "Luteinized unruptured follicle in the early stages of endometriosis as a cause of unexplained infertility." *Am J Obstet Gynecol* **167**(1): 271-3.

Moen M. H. (1995). "Why do women develop endometriosis and why is it diagnosed?" *Hum Reprod* **10**(1): 8-11.

Moen M. H. y Magnus P. (1993). "The familial risk of endometriosis." *Acta Obstet Gynecol Scand* **72**(7): 560-4.

Moghissi K. S. (1999). "Medical treatment of endometriosis." *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 620-32.

Moore J., Kennedy S. y Prentice A. (2000). "Modern combined oral contraceptives for pain associated with endometriosis." *Cochrane Database Syst Rev* **7**(2): CD001019.

Moretta L., Bottino C., Pende D., Mingari M. C., Biassoni R. y Moretta A. (2002). "Human natural killer cells: their origin, receptors and function." *Eur J Immunol* **32**(5): 1205-11.

Mungyer G., Willemsen W. N., Rolland R., Vemer H. M., Ramaekers F. C., Jap P. H. y Poels L. G. (1987). "Cell of the mucous membrane of the female genital tract in culture: a comparative study with regard to the histogenesis of endometriosis." *In Vitro Cell Dev Biol* **23**(2): 111-7.

Murray M. J., Zhang J. y Lessey B. A. (1999). "Expression of alpha6 and beta4 integrin subunits throughout the menstrual cycle: no correlation with uterine receptivity." *Fertil Steril* **72**(3): 522-6.

Muzii L., Marana R., Pedulla S., Catalano G. F. y Mancuso S. (1997). "Correlation between endometriosis-associated dysmenorrhea and the presence of typical or atypical lesions." *Fertil Steril* **68**(1): 19-22.

Namnoum A. B., Hickman T. N., Goodman S. B., Gehlbach D. L. y Rock J. A. (1995). "Incidence of symptom recurrence after hysterectomy for endometriosis." *Fertil Steril* **64**(5): 898-902.

Nieto M., Navarro F., Perez-Villar J. J., del Pozo M. A., Gonzalez-Amaro R., Mellado M., Frade J. M., Martinez A. C., Lopez-Botet M. y Sanchez-Madrid F. (1998). "Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions." *J Immunol* **161**(7): 3330-9.

Nirula R. y Greaney G. C. (2000). "Incisional endometriosis: an underappreciated diagnosis in general surgery." *J Am Coll Surg* **190**(4): 404-7.

Nisolle M., Casanas-Roux F. y Donnez J. (1997). "Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis." *Fertil Steril* **68**(5): 912-9.

Nisolle M., Casanas-Roux F. y Donnez J. (2000). "Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice." *Fertil Steril* **74**(2): 306-12.

Nisolle M., Casanas-Roux F. y Donnez J. (2000). "Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice." *Fertil Steril* **74**(2): 306-12.

Nisolle M. y Donnez J. (1997). "Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities [see comments]." *Fertil Steril* **68**(4): 585-96.

Nisolle M., Paindaveine B., Bourdon A., Berliere M., Casanas-Roux F. y Donnez J. (1990). "Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women." *Fertil Steril* **53**(6): 984-8.

Noble L. S., Simpson E. R., Johns A. y Bulun S. E. (1996). "Aromatase expression in endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* **81**(1): 174-9.

Odukoya O., Bansal A. y Cooke I. (1996). "Serum endometrial IgG antibodies and soluble CD23 concentrations in patients with endometriosis." *Acta Obstet Gynecol Scand* **75**(10): 927-31.

Okugawa K., Hirakawa T., Ogawa S., Kaku T. y Nakano H. (2002). "Ovarian endometrioid adenocarcinoma arising from an endometriotic cyst in a postmenopausal woman under tamoxifen therapy for breast cancer: a case report." *Gynecol Oncol* **87**(2): 231-4.

Olive D. L. y Henderson D. Y. (1987). "Endometriosis and mullerian anomalies." *Obstet Gynecol* **69**(3 Pt 1): 412-5.

Olive D. L. y Pritts E. A. (2002). "The treatment of endometriosis: a review of the evidence." *Ann N Y Acad Sci* **955**: 360-72; discussion 389-93, 396-406.

Olive D. L. y Schwartz L. B. (1993). "Endometriosis [see comments]." *N Engl J Med* **328**(24): 1759-69.

Olive D. L., Weinberg J. B. y Haney A. F. (1985). "Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology." *Fertil Steril* **44**(6): 772-7.

Oosterlynck D. J., Cornillie F. J., Waer M., Vandeputte M. y Koninckx P. R. (1991). "Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium." *Fertil Steril* **56**(1): 45-51.

Oosterlynck D. J., Meuleman C., Lacquet F. A., Waer M. y Koninckx P. R. (1994). "Flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of women with endometriosis." *Am J Reprod Immunol* **31**(1): 25-31.

Oosterlynck D. J., Meuleman C., Waer M. y Koninckx P. R. (1994). "Transforming growth factor-beta activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis." *Obstet Gynecol* **83**(2): 287-92.

Oosterlynck D. J., Meuleman C., Waer M., Koninckx P. R. y Vandeputte M. (1993). "Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis." *Obstet Gynecol* **82**(2): 206-12.

Oral E. y Arici A. (1997). "Pathogenesis of endometriosis." *Obstet Gynecol Clin North Am* **24**(2): 219-33.

O'Shea J. y Ortaldo R. (1992). *The biology of natural killer cells. The Natural Killer Cell*. J. O. D. McGee. Oxford, Oxford University Press: 2-40.

Overton C., Fernandez-Shaw S., Hicks B., Barlow D. y Starkey P. (1996). "Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain." *Hum Reprod* **11**(2): 380-6.

Overton C. E., Fernandez-Shaw S., Hicks B., Barlow D. H. y Starkey P. (1997). "In vitro culture of endometrial stromal and gland cells as a model for endometriosis: the effect of peritoneal fluid on proliferation." *Fertil Steril* **67**(1): 51-6.

Papapietro N., Gulino G., Zobel B. B., Di Martino A. y Denaro V. (2002). "Cyclic sciatica related to an extrapelvic endometriosis of the sciatic nerve: new concepts in surgical therapy." *J Spinal Disord Tech* **15**(5): 436-9.

Parazzini F. (1999). "Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi." *Hum Reprod* **14**(5): 1332-4.

Parazzini F., Fedele L., Busacca M., Falsetti L., Pellegrini S., Venturini P. L. y Stella M. (1994). "Postsurgical medical treatment of advanced endometriosis: results of a randomized clinical trial." *Am J Obstet Gynecol* **171**(5): 1205-7.

Parazzini F. y Ferraroni M. (1993). "Epidemiology of endometriosis." *Bmj* **306**(6882): 930-1.

Parazzini F., Ferraroni M., Bocciolone L., Tozzi L., Rubessa S. y La Vecchia C. (1994). "Contraceptive methods and risk of pelvic endometriosis." *Contraception* **49**(1): 47-55.

Park K. R., Inoue T., Ueda M., Hirano T., Higuchi T., Maeda M., Konishi I., Fujiwara H. y Fujii S. (2000). "CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins alpha(6), alpha(3) and beta(1)." *Mol Hum Reprod* **6**(3): 252-7.

Paul T. y Tedeschi L. G. (1972). "Perineal endometriosis at the site of episiotomy scar." *Obstet Gynecol* **40**(1): 28-34.

Phillips J. H., McKinney L., Azuma M., Spits H. y Lanier L. L. (1991). "A novel beta 4, alpha 6 integrin-associated epithelial cell antigen involved in natural killer cell and antigen-specific cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity." *J Exp Med* **174**(6): 1571-81.

Pigott R. y Power C. (1993). *LFA-3. The adhesion molecule*. A.Press. London, Harcourt Brace & Company: 98-9.

Portuondo J. A., Echanojauregui A. D., Herran C. y Alijarte I. (1983). "Early conception in patients with untreated mild endometriosis." *Fertil Steril* **39**(1): 22-5.

Prefumo F., Semino C., Melioli G. y Venturini P. L. (2002). "A defective expression of ICAM-1 (CD54) on secretory endometrial cells is associated with endometriosis." *Immunol Lett* **80**(1): 49-53.

Prentice A., Deary A. J. y Bland E. (2000). "Progestagens and anti-progestagens for pain associated with endometriosis." *Cochrane Database Syst Rev* **7**(2): CD002122.

Prentice A., Deary A. J., Goldbeck-Wood S., Farquhar C. y Smith S. K. (2000). "Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis." *Cochrane Database Syst Rev* **7**(2): CD000346.

Prystowsky J. B., Stryker S. J., Ujiki G. T. y Poticha S. M. (1988). "Gastrointestinal endometriosis. Incidence and indications for resection." *Arch Surg* **123**(7): 855-8.

Purvis R. S. y Tying S. K. (1994). "Cutaneous and subcutaneous endometriosis. Surgical and hormonal therapy." *J Dermatol Surg Oncol* **20**(10): 693-5.

Rana N., Braun D. P., House R., Gebel H., Rotman C. y Dmowski W. P. (1996). "Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis." *Fertil Steril* **65**(5): 925-30.

Regidor P. A., Vogel C., Regidor M., Schindler A. E. y Winterhager E. (1998). "Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium." *Hum Reprod Update* **4**(5): 710-8.

Rice V. M. (2002). "Conventional medical therapies for endometriosis." *Ann N Y Acad Sci* **955**: 343-52; discussion 389-93, 396-406.

Ridley J. y Edwards I. (1958). "Experimental endometriosis in the human." *Am J Obstet Gynecol* **61**: 440-42.

Rier S. E. y Yeaman G. R. (1997). "Immune aspects of endometriosis: relevance of the uterine mucosal immune system." *Semin Reprod Endocrinol* **15**(3): 209-20.

Ripps B. A. y Martin D. C. (1992). "Correlation of focal pelvic tenderness with implant dimension and stage of endometriosis." *J Reprod Med* **37**(7): 620-4.

Rodriguez-Escudero F. J., Neyro J. L., Corcostegui B. y Benito J. A. (1988). "Does minimal endometriosis reduce fecundity?" *Fertil Steril* **50**(3): 522-4.

Rosenfeld D. L. y Lecher B. D. (1981). "Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome." *Am J Obstet Gynecol* **139**(1): 105.

Russell W. (1899). "Ovarian cysts of müllerian origin." *Bull Johns Hopkins Hospital* **10**: 8-10.

Salamalekis E., Vasiliadis T. X., Kairi P. y Zourlas P. A. (1990). "Perineal endometriosis." *Int J Gynaecol Obstet* **31**(1): 75-80.

Salamonsen L. A., Butt A. R., Hammond F. R., Garcia S. y Zhang J. (1997). "Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(5): 1409-15.

Sampson J. (1927). "Metastatic or embolic endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into venous circulation." *Am J Pathol* **3**: 93-110.

Sampson J. A. (1925). "Endometrial carcinoma of the ovary arising in endometriai tissue in that organ." *Arch Surg* **10**: 1-72.

Sampson J. A. (1927). "Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity." *Am J Obstet Gynecol* **14**: 422.

Sanfilippo J. S., Wakim N. G., Schikler K. N. y Yussman M. A. (1986). "Endometriosis in association with uterine anomaly." *Am J Obstet Gynecol* **154**(1): 39-43.

Sangi-Haghpeykar H. y Poindexter A. N., 3rd (1995). "Epidemiology of endometriosis among parous women." *Obstet Gynecol* **85**(6): 983-92.

Santanam N., Murphy A. A. y Parthasarathy S. (2002). "Macrophages, oxidation, and endometriosis." *Ann N Y Acad Sci* **955**: 183-98; discussion 19-200, 396-406.

Sashiyama H., Shino Y., Sakao S., Shimada H., Kobayashi S., Ochiai T. y Shirasawa H. (2002). "Alteration of integrin expression relates to malignant progression of human papillomavirus-immortalized esophageal keratinocytes." *Cancer Lett* **177**(1): 21-8.

Schmid H. (1961). "Artificial endometriosis for therapeutic purposes." *Geburtshilfe Frauenheilkd* **21**: 679-85.

Scotti S., Regidor P. A., Schindler A. E. y Winterhager E. (2000). "Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis." *Mol Hum Reprod* **6**(7): 610-7.

Seidman J. D. (1996). "Prognostic importance of hyperplasia and atypia in endometriosis." *Int J Gynecol Pathol* **15**(1): 1-9.

Selak V., Farquhar C., Prentice A. y Singla A. (2000). "Danazol for pelvic pain associated with endometriosis." *Cochrane Database Syst Rev* **7**(2): CD000068.

Semino C., Semino A., Pietra G., Mingari M. C., Barocci S., Venturini P. L., Ragni N. y Melioli G. (1995). "Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis." *Fertil Steril* **64**(5): 909-16.

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

Sharpe-Timms K. L., Bruno P. L., Penney L. L. y Bickel J. T. (1994). "Immunohistochemical localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in matched endometriosis and endometrial tissues." *Am J Obstet Gynecol* **171**(3): 740-5.

Simpson J. L., Elias S., Malinak L. R. y Buttram V. C., Jr. (1980). "Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies." *Am J Obstet Gynecol* **137**(3): 327-31.

Singh K. K., Lessells A. M., Adam D. J., Jordan C., Miles W. F., Macintyre I. M. y Greig J. D. (1995). "Presentation of endometriosis to general surgeons: a 10-year experience." *Br J Surg* **82**(10): 1349-51.

Slomovitz B. M., Soslow R. A., Chang R. C., Golub R. y Kuo D. Y. (2002). "Serous adenocarcinoma of the inguinal region arising from endometriosis followed by a successful pregnancy." *Gynecol Oncol* **87**(1): 152-4.

Speroff L, Glass R.H. y N.G. K. (1999). *Endometriosis. Endocrinología ginecológica e infertilidad*. L. W. a. Wilkins. Madrid, España, Waverly Hispánica S.A.: 1058-1073.

Steele R. W., Dmowski W. P. y Marmer D. J. (1984). "Immunologic aspects of human endometriosis." *Am J Reprod Immunol* **6**(1): 33-6.

Stefansson H., Geirsson R. T., Steinhorsdottir V., Jonsson H., Manolescu A., Kong A., Ingadottir G., Gulcher J. y Stefansson K. (2002). "Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis." *Hum Reprod* **17**(3): 555-9.

Stovall D. W., Bowser L. M., Archer D. F. y Guzick D. S. (1997). "Endometriosis-associated pelvic pain: evidence for an association between the stage of disease and a history of chronic pelvic pain." *Fertil Steril* **68**(1): 13-8.

Surrey E. S. y Halme J. (1990). "Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro." *Obstet Gynecol* **76**(5 Pt 1): 792-7.

Sutton C. J., Ewen S. P., Whitelaw N. y Haines P. (1994). "Prospective, randomized, double-blind, controlled trial of laser laparoscopy in the treatment of pelvic pain associated with minimal, mild, and moderate endometriosis." *Fertil Steril* **62**(4): 696-700.

Sutton C. J., Pooley A. S., Ewen S. P. y Haines P. (1997). "Follow-up report on a randomized controlled trial of laser laparoscopy in the treatment of pelvic pain associated with minimal to moderate endometriosis." *Fertil Steril* **68**(6): 1070-4.

Tabibzadeh S. (1992). "Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle." *Hum Reprod* **7**(6): 876-82.

Tabibzadeh S., Kong Q. F. y Babaknia A. (1994). "Expression of adhesion molecules in human endometrial vasculature throughout the menstrual cycle." *J Clin Endocrinol Metab* **79**(4): 1024-32.

Tabibzadeh S. S. y Poubouridis D. (1990). "Expression of leukocyte adhesion molecules in human endometrium." *Am J Clin Pathol* **93**(2): 183-9.

Tawia S. A., Beaton L. A. y Rogers P. A. (1993). "Immunolocalization of the cellular adhesion molecules, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM), in human endometrium throughout the menstrual cycle." *Hum Reprod* **8**(2): 175-81.

TeLinde R. y Scott R. (1950). "Experimental endometriosis." *Am J Obstet Gynecol* **60**: 1147-73.

Thomson A. J., Greer M. R., Young A., Boswell F., Telfer J. F., Cameron I. T., Norman J. E. y Campbell S. (1999). "Expression of intercellular adhesion molecules ICAM-1 and

ICAM-2 in human endometrium: regulation by interferon-gamma." *Mol Hum Reprod* **5**(1): 64-70.

Ueda M., Yamashita Y., Takehara M., Terai Y., Kumagai K., Ueki K., Kanda K., Hung Y. C. y Ueki M. (2002). "Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis." *Gynecol Endocrinol* **16**(5): 391-402.

Umesaki N., Tanaka T., Miyama M., Mizuno K., Kawamura N. y Ogita S. (1999). "Increased natural killer cell activities in patients treated with gonadotropin releasing hormone agonist." *Gynecol Obstet Invest* **48**(1): 66-8.

Valiante N. M., Phillips J. H., Lanier L. L. y Parham P. (1996). "Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells." *J Exp Med* **184**(6): 2243-50.

van der Linden P. J., de Goeij A. F., Dunselman G. A., Erkens H. W. y Evers J. L. (1995). "Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle." *Fertil Steril* **63**(6): 1210-6.

Van der Linden P. J., de Goeij A. F., Dunselman G. A., Erkens H. W. y Evers J. L. (1996). "Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes." *Fertil Steril* **65**(1): 76-80.

Velebil P., Wingo P. A., Xia Z., Wilcox L. S. y Peterson H. B. (1995). "Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States." *Obstet Gynecol* **86**(5): 764-9.

Vessey M. P., Villard-Mackintosh L. y Painter R. (1993). "Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics." *Bmj* **306**(6871): 182-4.

Vigano P., Pardi R., Magri B., Busacca M., Di Blasio A. M. y Vignali M. (1994). "Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on cultured human endometrial stromal cells and its role in the interaction with natural killers." *Am J Reprod Immunol* **32**(3): 139-45.

Vigano P., Somigliana E., Gaffuri B., Santorsola R., Busacca M. y Vignali M. (2000). "Endometrial release of soluble intercellular adhesion molecule 1 and endometriosis: relationship to the extent of the disease." *Obstet Gynecol* **95**(1): 115-8.

Vigano P., Vercellini P., Di Blasio A. M., Colombo A., Candiani G. B. y Vignali M. (1991). "Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis." *Fertil Steril* **56**(5): 894-9.

Vignali M., Infantino M., Matrone R., Chiodo I., Somigliana E., Busacca M. y Vigano P. (2002). "Endometriosis: novel etiopathogenetic concepts and clinical perspectives." *Fertil Steril* **78**(4): 665-78.

Vinatier D., Dufour P. y Leroy J. L. (1999). “[The mechanisms of endometriosis].” *Rev Prat* **49**(3): 254-7.

Von Recklinghausen F. (1896). “Adenomyomas and cyadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the wolffian body.” *Wien Klin Wochenschr* **8**: 530.

Waller K. G. y Shaw R. W. (1993). “Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long-term follow-up.” *Fertil Steril* **59**(3): 511-5.

Weil S. J., Wang S., Perez M. C. y Lyttle C. R. (1997). “Chemotaxis of macrophages by a peritoneal fluid protein in women with endometriosis.” *Fertil Steril* **67**(5): 865-9.

Wilson M. L., Farquhar C. M., Sinclair O. J. y Johnson N. P. (2000). “Surgical interruption of pelvic nerve pathways for primary and secondary dysmenorrhoea.” *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD001896.

Wilson T. J., Hertzog P. J., Angus D., Munnery L., Wood E. C. y Kola I. (1994). “Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis [see comments].” *Fertil Steril* **62**(5): 1086-8.

Winkel C. A. (1999). “Combined medical and surgical treatment of women with endometriosis.” *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 645-63.

Witkowski C. M., Bowden G. T., Nagle R. B. y Cress A. E. (2000). "Altered surface expression and increased turnover of the alpha6beta4 integrin in an undifferentiated carcinoma." *Carcinogenesis* **21**(2): 325-30.

Witz C. A. (1999). "Current concepts in the pathogenesis of endometriosis." *Clin Obstet Gynecol* **42**(3): 566-85.

Witz C. A. (2000). "Interleukin-6: another piece of the endometriosis-cytokine puzzle." *Fertil Steril* **73**(2): 212-4.

Witz C. A., Monotoya-Rodriguez I. A. y Schenken R. S. (1999). "Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion." *Fertil Steril* **71**(1): 56-60.

Witz C. A., Montoya I. A., Dey T. D. y Schenken R. S. (1994). "Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis." *Am J Reprod Immunol* **32**(3): 173-9.

Witz C. A. y Schenken R. S. (1997). "Pathogenesis." *Semin Reprod Endocrinol* **15**(3): 199-208.

Wu M., Yang J., Chao K., Hwang J., Yang Y. y Ho H. (2000). "Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis." *Fertil Steril* **74**(6): 1187-91.

Wyshak G. y Frisch R. E. (2000). "Red hair color, melanoma, and endometriosis: suggestive associations." *Int J Dermatol* **39**(10): 798.

Xin Y., Xu X. y Ling H. (2000). "[Expression of major histocompatibility complex-class I antigen on endometrial stroma cells in patients with endometriosis]." *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **35**(9): 530-2.

Yackovich F. H., Bender G. N. y Tsuchida A. M. (1994). "Case report: peri-anal episiotomy scar endometrioma imaged by CT and sector endoluminal ultrasound." *Clin Radiol* **49**(8): 578-9.

Yeaman G. R., Collins J. E. y Lang G. A. (2002). "Autoantibody responses to carbohydrate epitopes in endometriosis." *Ann N Y Acad Sci* **955**: 174-82; discussion 199-200, 396-406.

Yokoyama W. M. (1998). "Natural killer cell receptors." *Curr Opin Immunol* **10**(3): 298-305.

Zahradnik H. P., Schafer W., Neulen J., Wetzka B., Gaillard T., Tielsch J. y Casper F. (1992). "The role of eicosanoids in reproduction." *Eicosanoids* **5 Suppl**: S56-9.

Zeitvogel A., Baumann R. y Starzinski-Powitz A. (2001). "Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model." *Am J Pathol* **159**(5): 1839-52.

Zondervan K., Cardon L. y Kennedy S. (2002). "Development of a Web site for the genetic epidemiology of endometriosis." *Fertil Steril* **78**(4): 777-81.

Zwas F. R. y Lyon D. T. (1991). "Endometriosis. An important condition in clinical gastroenterology." *Dig Dis Sci* **36**(3): 353-64.

9. ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estadía de la endometriosis.....	26
Tabla 2: Antecedentes familiares y personales	98
Tabla 3: Enfermedad actual y tratamiento	100
Tabla 4: Expresión de LFA-3, estudio piloto	102
Tabla 5: Expresión de ICAM-1, estudio piloto.....	106
Tabla 6: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio piloto	110
Tabla 7: Grupo Control, expresión de HLA-I, estudio piloto.....	111
Tabla 8: Grupo Endometriosis, expresión de HLA-I, estudio piloto.....	112
Tabla 9: Estudio definitivo, determinación de $\alpha 6\beta 4$. Distribución de controles y casos en función de la fase del ciclo menstrual.	116
Tabla 10: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo. Comparación entre ambos grupos considerando todas las muestras en conjunto, independientemente de la fase del ciclo.....	118
Tabla 11: Estudio definitivo, expresión de $\alpha 6\beta 4$, comparación entre muestras en fase proliferativa.	119
Tabla 12: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo, comparación entre muestras en fase secretora.	119
Tabla 13: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo, comparación entre muestras en fase secretora inicial.....	120
Tabla 14: Expresión de $\alpha 6\beta 4$, estudio definitivo. Comparación entre muestras en fase secretora tardía.	120
Tabla 15: Expresión de $\alpha 6\beta 4$ comparando fase proliferativa y fase secretora del grupo Endometriosis.....	121

Tabla 16: Estudio definitivo, determinación de HLA I. Distribución de controles y casos en función de la fase del ciclo menstrual.....	125
Tabla 17: Grupo Control, expresión de HLA-I, estudio definitivo.....	127
Tabla 18: Grupo Endometriosis, expresión de HLA-I, estudio definitivo.	129
Tabla 19: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras considerando ambas fases globalmente.....	130
Tabla 20: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras en fase proliferativa.....	131
Tabla 21: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras en fase secretora.	132
Tabla 22: Estudio definitivo, expresión de HLA I, comparación entre muestras en fase secretora tardía.	133
Tabla 23: Comparación de la expresión de HLA I entre muestras en fase proliferativa y muestras en fase secretora del grupo Endometriosis.	134
Tabla 24: Distribución de casos y controles en función de una expresión de HLA I en glándulas igual o inferior al 100% de las células.....	138
Tabla 25: Distribución de casos y controles en función de una expresión de HLA I en estroma superior al 20% de las células.....	138
Tabla 26: Concordancia en la expresión de HLA I entre glándulas y estroma.....	139
Tabla 27: Concordancia entre la expresión de HLA-I en las glándulas y la expresión de $\alpha6\beta4$	140
Tabla 28: Concordancia entre la expresión de HLA I en el estroma y expresión de $\alpha6\beta4$	141
Tabla 29: Número de pacientes en cada grupo que presentaban cero, una, dos o tres de las “alteraciones”.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación tridimensional de la estructura de HLA I.....	56
Figura 2: Representación gráfica de la integrina $\alpha 6\beta 4$	58
Figura 3: Representación esquemática de la interacción ICAM-1/LFA-1, ICAM-2/LFA-1 y LFA-3/CD2.....	60
Figura 4: Expresión de LFA-3, paciente 47, grupo control. Magnificación óptica x400.	103
Figura 5: Expresión de CD-2, paciente 47, grupo Control. Magnificación óptica x400.	104
Figura 6: Expresión de ICAM-1, paciente 53, grupo Endometriosis. Magnificación óptica x400.	107
Figura 7: Expresión de LFA-1, paciente 32, grupo Endometriosis. Magnificación óptica x400.	108
Figura 8: Expresión basal (polarizada) de $\alpha 6\beta 4$, paciente 60, grupo Control. Magnificación óptica x400.	122
Figura 9: Expresión en toda la membrana celular (despolarizada) de $\alpha 6\beta 4$, paciente 44, grupo Endometriosis. Magnificación óptica x400.....	123
Figura 10: Expresión de HLA I, paciente 46, grupo Control. Glándulas 50%, estroma 20%. Magnificación óptica x400.	135
Figura 11: Expresión de HLA I, paciente 51, grupo Endometriosis. Glándulas 10%, Estroma 100%. Magnificación óptica x400.....	136

ABREVIACIONES

ACO	Anticonceptivos orales
AFS	<i>American Fertility Society</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DIU	Dispositivo intrauterino
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GnRH	<i>Gonadotrophin releasing hormone</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HLA-B7	<i>Human Leukocyte Antigen B7</i>
HLA E	<i>Human Leukocyte Antigen E</i>
HLA-G	<i>Human Leukocyte Antigen G</i>
HLA I	<i>Human Leukocyte Antigen clase I</i>
HLA Ib	<i>Human Leukocyte Antigen Ib</i>
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
ICAM-2	<i>Intercellular Adhesion Molecule-2</i>
ICAM-3	<i>Intercellular Adhesion Molecule-3</i>
IF- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6

IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
KIR	<i>Killer Ig-like Receptors</i>
LFA-1	<i>Leukocyte Function Associated-1</i>
LFA-3	<i>Leukocyte Function Associated-3</i>
LUF	<i>Luteinized Unruptured Follicle Syndrome</i>
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptors:</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OR	Odds Ratio
TGF- β	<i>Tumor Growth Factor-β</i>
Th-2	Linfocitos T Helper tipo 2
Th1	Linfocitos T helper tipo 1
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>