



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Biomarcadores angiogénicos en endometriosis

Taisiia Melnychuk Mykhaylevska

Tesis Doctoral 2022

Universidad Autónoma de Barcelona

“Biomarcadores angiogénicos en endometriosis”

Tesis Doctoral presentada por:

Taisiia Melnychuk Mykhaylevska

Para obtener el grado de

Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)

Tesis Doctoral realizada en el Hospital Universitario de Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca y Universidad Autónoma de Barcelona y supervisada por Directores:

Prof. Dr. Antonio Gil Moreno, Dra. Eva Colás Ortega

Tutor:

Prof. Dr. Antonio Gil Moreno

Estudio doctoral realizado en el Departamento de Pediatría, Obstetricia, Ginecología y Medicina Preventiva

Barcelona, 19 de septiembre de 2022

Universidad Autónoma de Barcelona

Conformidad de los directores de la tesis

Prof. Dr. Antonio Gil Moreno

Dra. Eva Colás Ortega

Certifican:

Que el trabajo titulado “Biomarcadores angiogénicos en endometriosis” presentada por la doctoranda Taisiia Melnychuk Mykhaylevska para optar al grado de Doctora en Medicina es idóneo y que se ha realizado bajo mi dirección (Prof. Dr. Antonio Gil Moreno, Dra. Eva Colás Ortega), asimismo autorizan su presentación para ser valorada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firmo la presente certificación en Barcelona a 19 de septiembre de 2022.

Prof. Dr. Antonio Gil Moreno

Dra. Eva Colás Ortega

Dedicatoria

A mi marido Albert y a mi hija Carla

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Con este escrito, quisiera agradecer a todos quienes de alguna manera han colaborado con este proyecto.

En primer lugar, agradecer a mis directores de la tesis: Antonio Gil Moreno y Eva Colás Ortega. Al Prof. Dr. Antonio Gil Moreno por la dirección de la tesis y por el tiempo dedicado a las reuniones del “grupo investigador en endometriosis”, por creer en el proyecto y por darme la oportunidad de llevarlo a cabo. A la Dra. Eva Colás Ortega, por interesarte en mi tema y por hacerte imprescindible desde que empezó nuestra colaboración, por estar siempre allí, por meterme caña. Sin ti, este proyecto no hubiera salido adelante. ¡Gracias!

Una especial mención a la Dra. Elena Suarez Salvador por empezar juntas este proyecto y por apoyarme desde el principio, cuando yo no tenía claro ni por dónde empezar. Por introducirme en el mundo de la endometriosis y por enseñarme, por aceptarme en el grupo de investigación en endometriosis y por ayudarnos a lo largo de toda la investigación.

A la Dra. Elisa Llurba por habernos puesto la mirada sobre la dirección de la investigación y por ayudar con los inicios del proyecto. A Olga Sánchez por su colaboración y ayuda, dada su experiencia en el grupo de trabajo de la Dra. Elisa Llurba.

A Júlia, con quién también empezó este proyecto por colaboración con su tesis. A Carlos, que le tomó el relevo y que se hizo imprescindible en este trabajo. Gracias por todas las horas dedicadas y por tu disponibilidad. Agradecer también a Christian Moiola por la colaboración con los modelos animales.

Al departamento de Anatomía Patológica, sobre todo a Josep Castellví por aceptar participar en el proyecto, cuando las cosas al inicio estaban poco claras.

A todo el departamento de Ginecología y Obstetricia, por haberme dado la oportunidad de formarme, de trabajar allí y llevar a cabo este precioso proyecto.

Especialmente al equipo de ginecología endoscópica benigna, gracias a aquellas personas que han colaborado en la recogida de las muestras: Laura Mañalich, Eva Vila, Montse Cubo, Anabel Montero. Anabel, no sólo te agradezco la recogida de muestras, sabes que te tengo un cariño especial, gracias por ayudarme a traer al mundo a Carla, por escucharme, por preocuparte por mí, por ser tan simpática y alegre y por ayudarme en todo. A las auxis de la consulta de los miércoles: Ana, Julia y enfermera Miriam, por apoyarme, por su cariño y cercanía y por la ayuda con la recogida de muestras. También al personal de quirófano: enfermeras y auxiliares por la recogida de las muestras.

A mi familia, sobre todo a Albert por haberme regalado tiempo para acabar la tesis, por arreglarlo todo mientras yo estaba con la “excusa” de la tesis. Por la paciencia infinita que ha tenido conmigo y con Carla. A Carla, por conformarse con que “mamá está trabajando”. A mis padres por estar siempre allí y por su apoyo incondicional. A mi hermana por escucharme, por las largas llamadas telefónicas de desahogo, por estar allí. A mis amigos que se han preocupado por la evolución de la tesis y me han acompañado en el camino: a Mireia, Cecilia, Miriam. A Anna Ruano por colaborar puntualmente en el proyecto.

A aquellas personas que creyeron en mí y me ayudaron a iniciarme en el mundo de la medicina. Sobre todo, a Arantxa y su familia. Gracias, porque sin vosotros esto no hubiera sido posible. ¡Gracias!

A las pacientes que forman parte de este estudio, por haber aceptado a participar y cuyo bienestar es el motor de este trabajo.

A todas las personas que de alguna forma directa o indirecta han participado en este proyecto.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	17
ÍNDICE DE TABLAS.....	20
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	26
1.1. CONCEPTOS GENERALES DE ENDOMETRIOSIS.....	28
1.2. ETIOPATOGENIA (TEORÍAS DE ENDOMETRIOSIS).....	31
1.3. TIPOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE ENDOMETRIOSIS.....	35
1.4. MANEJO TERAPEUTICO.....	40
1.4.1. Tratamiento médico.....	40
1.4.2. Tratamiento quirúrgico.....	44
1.4.3. Fracaso del tratamiento médico.....	46
1.5. ALTA TASA DE RECIDIVAS.....	47
1.6. AGRESIVIDAD DE FORMAS PROFUNDAS.....	49
1.7. BIOMARCADORES EN ENDOMETRIOSIS.....	50
1.8. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	56
2. HIPÓTESIS.....	59
3. OBJETIVOS.....	63
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	68
4.1. DISEÑO.....	70
4.2. BLOQUE 1.....	71
4.2.1. Participantes.....	71
4.2.2. Recogida de muestras de sangre.....	73
4.2.3. Procesamiento de muestras de sangre.....	73
4.2.4. Determinación de factores angiogénicos en plasma. ELISA.....	74
4.3. BLOQUE 2.....	76
4.3.1. Participantes.....	76
4.3.2. Recogida de muestras de aspirado endometrial.....	78
4.3.3. Procesamiento de muestras de aspirado endometrial.....	78

4.4. BLOQUE 3.....	78
4.4.1. Participantes.....	79
4.4.2. Recogida de muestras de tejido endometriósico.....	80
4.4.3. Procesamiento de muestras de tejido endometriósico.....	80
4.5. EXTRACCION DE RNA.....	81
4.5.1. Tejido parafinado.....	81
4.6. DETERMINACIÓN DE INTEGRIDAD Y CALIDAD DE RNA.....	84
4.7. RTqPCR.....	85
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	88
5. RESULTADOS.....	90
5.1. BLOQUE 1.....	92
5.1.1. Características clínicas de las participantes.....	92
5.1.2. Niveles de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes control y endometriosis como biomarcadores diagnósticos.....	93
5.1.3. Niveles de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones	97
5.1.4. Análisis de expresión de proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma para evaluación de endometriosis recurrente.....	101
5.2. BLOQUE 2.....	102
5.2.1. Características clínicas de las participantes.....	102
5.2.2. Niveles de expresión proteica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis como biomarcadores diagnósticos.....	104
5.2.3. Niveles de expresión proteica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones.....	108
5.2.4. Análisis de expresión proteica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado endometrial para evaluación de endometriosis recurrente.....	112
5.3. BLOQUE 3.....	116
5.3.1. Características clínicas de las participantes.....	116

5.3.2. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis.....	118
5.3.3. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones.....	120
5.3.4. Análisis de la expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado para evaluación de recurrencia.....	124
6. DISCUSIÓN.....	133
7. FORTALEZAS Y LIMITACIONES.....	150
8. CONCLUSIONES.....	155
9. BIBLIOGRAFÍA.....	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas guía de sospecha de endometriosis.....	29
Figura 2. Diagnosticando endometriosis.....	30
Figura 3. Teorías de la patogénesis de endometriosis.....	31
Figura 4. Diagrama esquemático de los eventos que ocurren en la pelvis durante la menstruación retrógrada y reflejo de eventos celulares y bioquímicos que están implicados en la patogénesis de endometriosis.....	32
Figura 5. Clasificación revisada de endometriosis de la asociación americana de medicina reproductiva.....	36
Figura 6. Clasificación de Enzian revisada.....	37
Figura 7. Medicación utilizada en endometriosis.....	41
Figura 8. Quistectomía laparoscópica de endometrioma ovárico.....	45
Figura 9. Neovascularización en la patogénesis de endometriosis.....	54
Figura 10. Diagrama de flujo de las participantes en el estudio.....	71
Figura 11. Fracciones sanguíneas después del centrifugado.....	73
Figura 12. ELISA tipo Sándwich.....	75
Figura 13. Región anatómica de obtención de la muestra de ligamento uterosacro.....	80
Figura 14. Marcaje de tejido, obtención de rollitos tisulares y extracción de RNA y DNA.....	83
Figura 15. Funcionamiento de la sonda TaqMan.....	87
Figura 16. Niveles de expresión de proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes control y endometriosis.....	95

Figura 17. Niveles de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes control y endometriosis de diferentes localizaciones.....	99
Figura 18. Niveles de expresión de proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis primaria y endometriosis recurrente.....	101
Figura 19. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes con endometriosis y controles.....	105
Figura 20. Curvas ROC para Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales comparando pacientes con endometriosis y controles.....	107
Figura 21. Expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes con diferentes localizaciones de endometriosis y controles.....	110
Figura 22. Expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado endometrial de pacientes control y endometriosis recurrente, no recurrente, endometriosis profunda recurrente y no recurrente, endometriosis ovárica recurrente y no recurrente..	114
Figura 23. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes con endometriosis y controles.....	119
Figura 24. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones.....	122
Figura 25. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis profunda primaria y recurrente.....	127
Figura 26. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis ovárica primaria y recurrente.....	128
Figura 27. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis primaria recurrente y no recurrente.....	130

Figura 28. Curvas ROC para Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de endometriosis primaria recurrente y no recurrente como factores pronósticos de la recurrencia.....	131
Figura 29. Vías de activación de endometriosis.....	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de plasma de pacientes con endometriosis.....	72
Tabla 2. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de plasma en pacientes control.....	72
Tabla 3. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de aspirado endometrial en pacientes con endometriosis.....	77
Tabla 4. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de aspirado endometrial en pacientes control.....	77
Tabla 5. Criterios de inclusión-exclusión para para la recogida de muestras control de tejido endometriósico.....	79
Tabla 6. Utilidad de las muestras de RNA en función del valor RIN.....	85
Tabla 7. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 1.....	93
Tabla 8. Promedio de expresión en plasma de sEng, sFlt-1 y PIGF en grupo control y endometriosis, endometriosis profunda y endometriosis ovárica.....	96
Tabla 9. Comparaciones ROC para reflejar la capacidad diagnóstica de Eng, sFlt-1 y PIGF en plasma.....	97
Tabla 10. Promedio de expresión en plasma de sEng, sFlt-1 y PIGF en grupo control y diferentes localizaciones de endometriosis, incluyendo adenomiosis, endometriosis ovárica-profunda, endometriosis profunda sin afectación orgánica y endometriosis profunda con afectación orgánica.....	100

Tabla 11. Promedio de expresión en plasma de sEng, sFlt-1 y PIGF en grupo control y endometriosis primaria y recurrente.....	102
Tabla 12. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 2.....	103
Tabla 13. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis, así como sus subtipos (endometriosis profunda y endometriosis ovárica).....	106
Tabla 14. Comparaciones ROC para reflejar la capacidad diagnóstica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales.....	108
Tabla 15. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y diferentes localizaciones de endometriosis, incluyendo adenomiosis, endometriosis ovárica-profunda, endometriosis profunda sin afectación orgánica y endometriosis profunda con afectación orgánica...111-112	
Tabla 16. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis con y sin recurrencia, así como endometriosis profunda con y sin recurrencia y endometriosis ovárica con y sin recurrencia.....	115
Tabla 17. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 3. Endometriosis vs controles.....	117
Tabla 18. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 3. Endometriosis profunda vs controles, endometriosis ovárica vs controles. Endometriosis profunda vs endometriosis ovárica.....	117
Tabla 19. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriótico de pacientes control y endometriosis, así como sus subtipos (endometriosis profunda y endometriosis ovárica).....	119

Tabla 20. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y diferentes localizaciones de endometriosis, incluyendo endometriosis ovárica, endometriosis profunda, adenomiosis, endometriosis ovárica-profunda, endometriosis profunda sin afectación orgánica y endometriosis profunda con afectación orgánica.....123-124

Tabla 21. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control, endometriosis profunda primaria y recurrente y endometriosis ovárica primaria y recurrente.....125-126

Tabla 22. Comparaciones ROC para reflejar la capacidad pronóstica de recurrencia de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado.....131

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACO – anticonceptivos combinados orales	DNA – ácido desoxirribonucleico
AINES – medicamentos antiinflamatorios no esteroideos	EBAF – factor asociado al sangrado endometrial
AMH – hormona antimülleriana	EDTA – ácido etilendiaminotetraacético
Angs – angiopoyetinas	EFI – índice de fertilidad en endometriosis
ASRM – sociedad Americana de medicina reproductiva	ELISA – ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
AUC – área bajo la curva	Eng – endoglina
BCL2 – regulador de apoptosis 2	eNOS – sintasa endotelial de óxido nítrico
bFGF – factor básico de crecimiento de fibroblasto	EO – endometriosis ovárica
°C – grados Celsius	EOP – endometriosis ovárica-profunda
CA – California	EP – endometriosis profunda
cc – centímetros cúbicos	FIV – fertilización in vitro
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementario	Flt-1 – tirosina quinasa 1 tipo fms
CL – capa leucocítica	g – fuerza centrífuga relativa
cm – centímetros	gDNA - ácido desoxirribonucleico genómico
CO2 – dióxido de carbono	GnRH – hormona liberadora de gonadotropina
COX - ciclooxigenasa	HGF – factor de crecimiento hepatocitario
CYFRA 21-1 – anticuerpo monoclonal que reconoce un fragmento de la citoqueratina 19	HOX – proteína homeobox
DIU-LNG – dispositivo intrauterino con Levonorgestrel	HUVH – Hospital Universitario Vall d’Hebron
DLL4 – de inglés delta-like 4	

IL – interlequininas

IKKB – inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta

LNG-IUS (siglas en inglés) – dispositivo intrauterino con Levonorgestrel

LU – ligamento uterosacro

MAPK o MAPK/ERK – la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos

µg – microgramos

µl – microlitros

ml – mililitros

microRNA – pequeñas moléculas de RNA no codificantes que regulan la expresión génica post-transcripcional

mm – milímetros

MMP – matriz de metaloproteinasas

N – número de pacientes

NF-κB – factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ng – nanogramos

NGF – factor de crecimiento nervioso

NK – asesina natural

nm – nanómetro

NSAIDS (siglas en inglés) – medicamentos antiinflamatorios no esteroideos

OMS – organización mundial de la salud

PBS – solución salina tamponada con fosfato

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

PDGF – factor de crecimiento derivado de plaquetas

pg – picogramos

PG – prostaglandinas

PGP – producto génico protéico

PIGF – factor de crecimiento placentario

PI3K – fosfoinositol 3-quinasa

PTEN – fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3- fosfatasa

QOS – quiste de ovario simple

qPCR – reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

r-ASRM – clasificación revisada de la sociedad americana de medicina reproductiva

RIN – número de integridad de RNA

RMN – resonancia magnética

RNA – ácido ribonucleico

ROC – de inglés Receiver Operating Characteristic

ROS – de inglés reactive oxygen species

rpm – revoluciones por minuto

RT-PCR – reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RTqPCR – reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

sEng – endoglina soluble

sFit-1 – tirosina quinasa 1 soluble tipo fms

SN – sobrenadante

SNS – Sistema Nacional de Salud

TGF- β - factor de crecimiento transformador beta

TIMP – inhibidor tisular de metaloproteinasas

TNF – factor de necrosis tumoral

TNF α - factor de necrosis tumoral alfa

um – micrómetro

USA – Estados Unidos

VEGF – factor de crecimiento de endotelio vascular

VEGFR – receptor de factor de crecimiento de endotelio vascular

VHIR – Vall d'Hebron Institut de Recerca

XIAP – inhibidor de apoptosis ligado a cromosoma X

17- β -E2 - estradiol

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTOS GENERALES DE ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es una condición inflamatoria crónica (de larga evolución) que afecta al 6-10% de mujeres en edad reproductiva¹. Se define por la presencia de tejido similar al endometrio en localizaciones extrauterinas, sobre todo en el área pélvica incluyendo ovarios, saco de Douglas, ligamento ancho, trompas de Falopio, septo rectovaginal, ligamento redondo y superficie peritoneal, así como colon sigmoideo, apéndice y vejiga. En ocasiones menos frecuentes puede presentarse en vagina, cérvix, intestino delgado, canal inguinal, ombligo, uréter. Se han descrito casos en pericardio, pleura y diafragma^{1,2}.

La endometriosis afecta a 50 - 60% de mujeres y adolescentes con dolor pélvico y hasta 50% de mujeres con infertilidad^{3,4}. La enfermedad se suele manifestar entre la menarquia y la menopausia, pero también se han descrito casos en chicas premenárrquicas y recurrencias después de la menopausia². Las lesiones endometriósicas son hormono-dependientes y responden a cambios del ciclo menstrual, pudiendo tener presentación fenotípica variable como por ejemplo lesiones de coloración rojiza, marrones, negras, blancas, amarillas, rosas o incluso en forma de vesículas. Los 3 grandes tipos clínico-patológicos son endometriosis superficial, quistes endometriósicos también llamados endometriomas y nódulos de endometriosis profunda (son aquellos que infiltran más de 5 mm en profundidad). A pesar de que se trata de una condición benigna, la endometriosis se comporta como un tumor maligno, en cuanto a su capacidad de crecer, infiltrar y adherirse a tejidos que la rodean. Dependiendo del tiempo de evolución de las lesiones, estas pueden contener un grado variable de inflamación, hemorragia, adherencias y fibrosis.

Se trata de una enfermedad estrógeno dependiente y la manifestación clínica es variable, pudiendo causar dismenorrea, dispareunia, disuria y disquecia⁵. Las manifestaciones clínicas abarcan un amplio espectro, encontrando desde personas asintomáticas hasta formas severas y crónicas con síntomas dolorosos intensos y/o infertilidad asociada, que pueden requerir varias intervenciones quirúrgicas y para las que no se consigue un tratamiento curativo.

Aproximadamente un tercio de las pacientes son asintomáticas. Si presentan síntomas, el más común es el dolor pélvico⁶.

Síntomas guía de sospecha de endometriosis

1. Dolor

- Dismenorrea que no cede con el tratamiento habitual
- Dolor pélvico crónico
- Dispareunia intensa con la penetración profunda
- Disquecia cíclica con o sin rectorragia

2. Infertilidad

Figura 1. Síntomas guía de sospecha de endometriosis. Imagen adaptada de la guía de atención a las mujeres con endometriosis en el Sistema Nacional de Salud (SNS)⁷.

El dolor pélvico crónico y la infertilidad son muy comunes^{8,9}, lo que afecta significativamente a la calidad de vida de las pacientes, pudiendo llegar a ser incapacitante en un porcentaje relevante de mujeres afectas, además de incrementar costes económicos en el sistema nacional de salud¹⁰. Otros síntomas que pueden presentar las mujeres con endometriosis son dolor abdominal no cíclico, dolor lumbar, hematuria, rectorragia, hemoptisis, etc. La intensidad de los síntomas no guarda obligatoriamente relación con la extensión anatómica de la enfermedad. En general, los síntomas son más intensos durante el periodo menstrual, debido al aumento de mediadores inflamatorios, disfunción neurológica y neuromodulación de neuronas sensoriales periféricas estrógeno dependiente¹¹. Algunos estudios han encontrado aumento de número de células inflamatorias similares a macrófagos y citoquinas proinflamatorias como interleuquina (IL)-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)¹². Por contrapartida, los síntomas suelen mejorar en la menopausia y durante la gestación.

En cuanto a la infertilidad, se cree que puede deberse a varios motivos como presencia de adherencias, quistes ováricos y cambios anatómicos en las trompas. El exceso de producción de mediadores inflamatorios también resulta en función subóptima y daño a los ovocitos y al esperma y disminuyen la receptividad de endometrio¹³. También hay estudios que demuestran una disminución de la reserva ovárica predicha por niveles bajos de hormona antimülleriana (AMH) en pacientes con endometriosis¹⁴.

La endometriosis es una condición médica de difícil diagnóstico, ya que la mayoría de las pacientes están asintomáticas o presentan síntomas atípicos. El diagnóstico final hasta hace poco requería cirugía y confirmación histopatológica de las lesiones, lo que podría conllevar retrasos en el diagnóstico, que desafortunadamente puede tardar años. Hasta hace pocos meses, el gold estándar para el diagnóstico era la cirugía laparoscópica, que no está exenta de riesgos y puede conllevar una gran morbilidad e incluso mortalidad. Actualmente no existen marcadores séricos diagnósticos de endometriosis. Pruebas de imagen como ecografía transvaginal y resonancia magnética (RMN) son útiles para evaluar pacientes con endometriosis y se consideran de elección para hacer el diagnóstico.

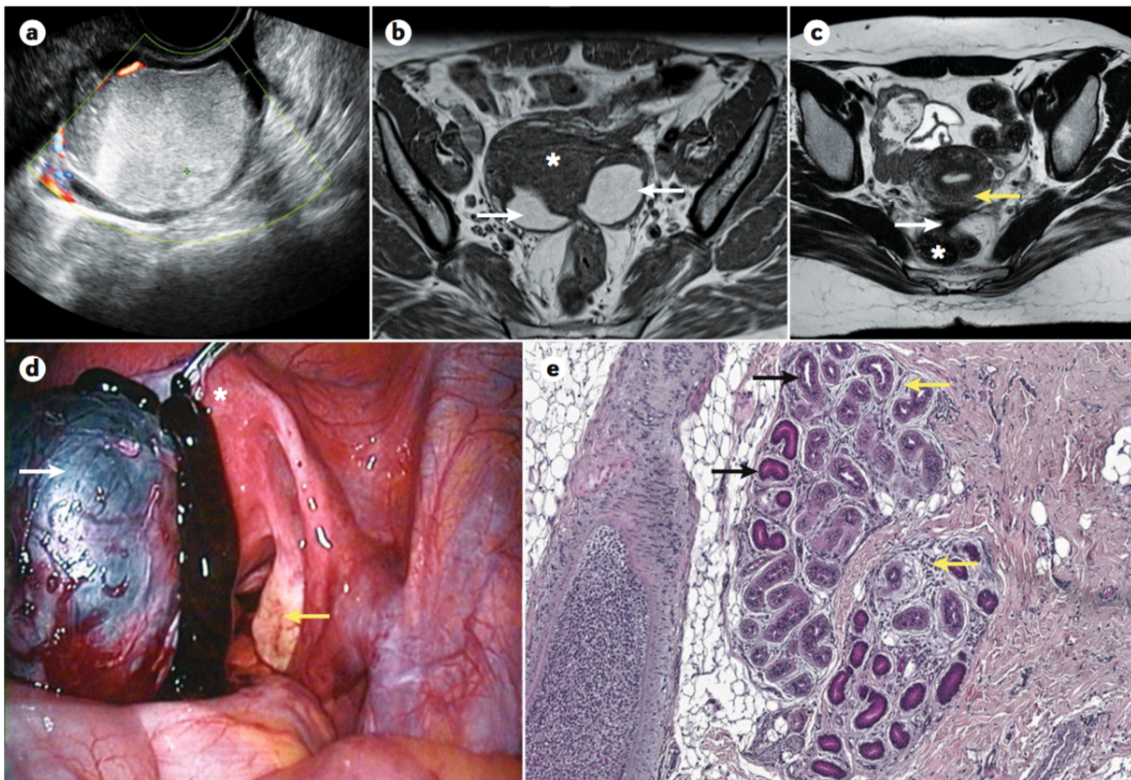


Figura 2. Diagnosticando endometriosis. Ecografía transvaginal con flujo Doppler muestra un endometrioma izquierdo (panel a). RMN de pelvis femenina potenciada en T1-muestra endometriomas bilaterales (flechas) detrás del útero (asterisco; panel b) imagen característica que recibe un nombre de “kissing ovaries”. RMN pélvica mostrando endometriosis (panel c). Se trata de un nódulo fibrótico (flecha blanca) extendiéndose a través de la fascia de mesorrecto y grasa y estenotando la serosa del recto (asterisco). Imagen intraoperatoria de endometrioma izquierdo roto (panel d). El líquido marrón denso que sale del quiste es el origen del nombre característico que reciben estos quistes “quiste de chocolate”. Tinción de hematoxilina-eosina de

un corte parafinado de endometriosis profunda con células epiteliales glandulares (flechas negras) y células del estroma (flechas amarillas; panel e) ×200 aumentos. Imagen adaptada de Zondervan KT et al.².

La ecografía transvaginal debería ser la prueba de primera línea de evaluación en endometriosis. Sirve sobre todo para el diagnóstico de endometriomas, aunque en manos expertas también tiene alta sensibilidad 91% y especificidad 98% para el diagnóstico de endometriosis profunda¹⁵. La RMN también es útil en el diagnóstico de endometriosis profunda, pero debería ser prueba de segunda línea, reservándose para casos difíciles y es de utilidad sobre todo para diagnóstico de endometriosis de intestino delgado.

1.2 ETIOPATOGENIA (TEORÍAS DE ENDOMETRIOSIS)

La limitación de encontrar un tratamiento médico efectivo subyace en la falta de conocimiento de la etiopatogenia de endometriosis. Se han descrito varias teorías acerca de la fisiopatología de la enfermedad, siendo la de Sampson de la menstruación retrógrada del año 1927 la más aceptada.

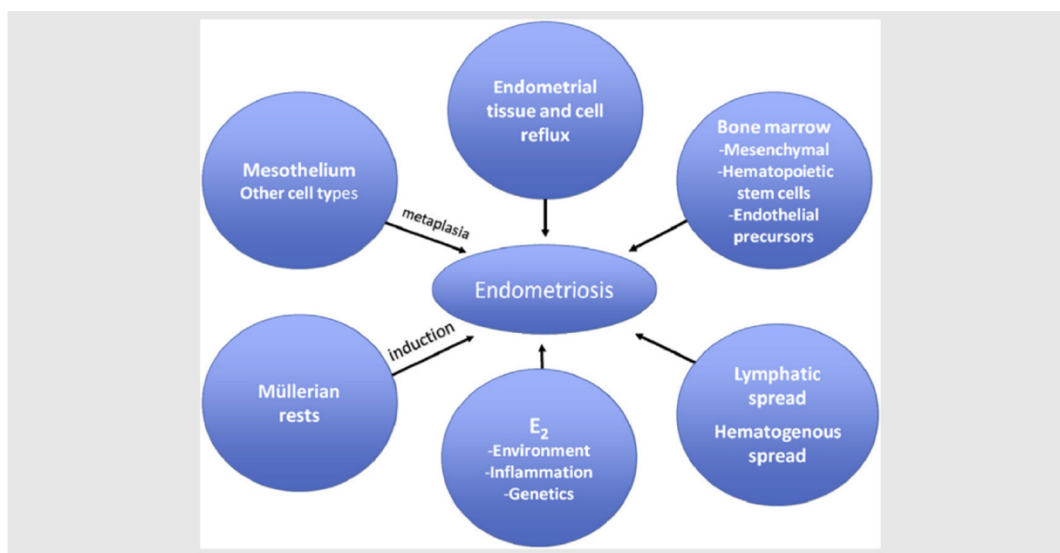


Figura 3. Teorías de la patogénesis de endometriosis. Imagen adaptada de Burney RO et al.¹⁶.

Según la *teoría de Sampson*¹⁷, durante la menstruación, los fragmentos de endometrio pasan retrógradamente por las trompas de Falopio a la cavidad

peritoneal, implantándose en peritoneo y ovarios. La presencia de la enfermedad en la pelvis se atribuye a la implantación de fragmentos endometriales en el epitelio peritoneal, invasión del mismo, establecimiento de aporte sanguíneo, generación de una respuesta inmune subóptima que no lucha adecuadamente contra los implantes, resultando en un continuo crecimiento y supervivencia de las lesiones⁸.

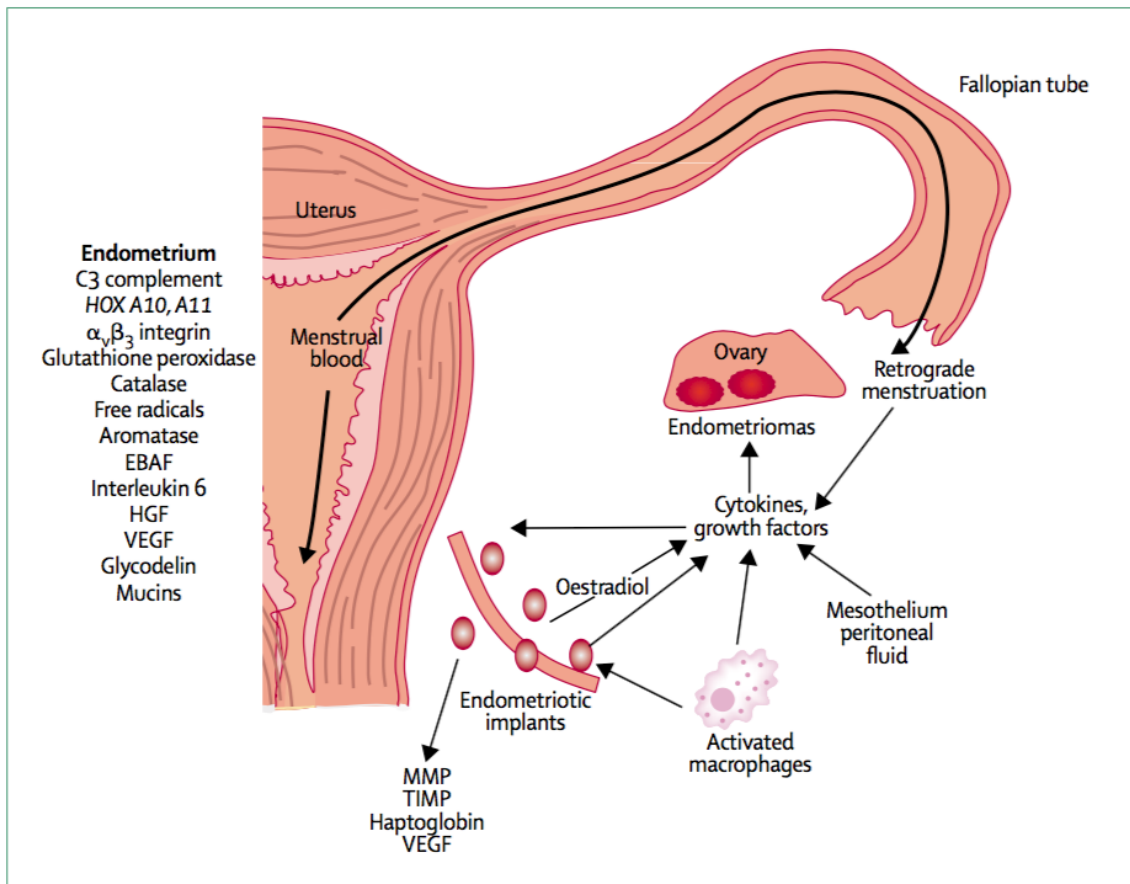


Figura 4. Diagrama esquemático de los eventos que ocurren en la pelvis durante la menstruación retrógrada y reflejo de eventos celulares y bioquímicos que están implicados en la patogénesis de endometriosis, EBAF=factor asociado al sangrado endometrial; HGF=factor de crecimiento hepatocitario; VEGF=factor de crecimiento de endotelio vascular; MMP=matriz de metaloproteinasas; TIMP=inhibidor tisular de metaloproteinasas. Imagen de Giudice LC et al⁸.

La *teoría de la menstruación retrógrada* se sostiene por la existencia de una mayor concentración de volumen de menstruación y tejido endometrial en pacientes con enfermedad que en mujeres sin endometriosis¹⁸, además, la endometriosis es más frecuente en patologías con alteración del flujo menstrual anterógrado¹⁹. Por otro lado, la distribución asimétrica de las lesiones, siendo la

mayoría en el saco de Douglas o hemipelvis izquierda también apoyan la teoría de la menstruación retrógrada¹⁹. En el caso de saco de Douglas, por depósito del material refluído por la gravedad y, en la hemipelvis izquierda, por el sigma que actúa como retención para el flujo menstrual, favoreciendo un mayor tiempo de contacto y la implantación de endometriosis.

Aunque la menstruación retrógrada está presente en el 90% de la población femenina, sin embargo, solo alrededor de un 10% tienen endometriosis, además existe endometriosis extraperitoneal, por lo que esta teoría no explica toda la patogénesis de la enfermedad.

Otras teorías incluyen metaplasia celómica, el origen de células madre, diseminación linfática y hematógena, restos Müllerianos. Además, la etiopatogenia está influenciada por otros factores como, predisposición genética, hormonas, estatus inmunológico y exposición ambiental a ciertos agentes²⁰.

Metaplasia del epitelio celómico también podría contribuir al establecimiento de la enfermedad. Esta teoría implica la transformación de tejido peritoneal normal en tejido endometrial ectópico. Es decir, por la transdiferenciación del mesotelio, que implica reprogramación de células madre mesenquimales multipotentes derivadas de la médula ósea en epitelio endometrial y células del estroma en zonas ectópicas². Se cree que esta transformación está influenciada por factores ambientales, como factores hormonales, infecciosos e inmunológicos, y que explicaría la formación de endometriomas y endometriosis rectovaginal⁸. Embriológicamente el peritoneo pélvico, abdominal, pleura torácica y conductos Müllerianos derivan de la pared celómica de un embrión en desarrollo. De allí, se sugiere que la metaplasia celómica además explique el origen de la endometriosis extrapélvica, como, por ejemplo, nódulos linfáticos, pulmones, cerebro y fosas nasales.

La *teoría de metástasis linfática y hematógena* sostiene que las células endometriales y fragmentos tisulares viajan desde la cavidad uterina a través de vasos linfáticos y sanguíneos para colonizar localizaciones ectópicas. Estudios microvasculares demuestran la existencia de flujo linfático desde el útero hacia

el ovario, lo que podría explicar el origen de la endometriosis ovárica. La endometriosis de nódulos linfáticos ha sido documentada en modelos inducidos de endometriosis en primates²¹. La teoría de diseminación linfática se basa en el hecho de observar tejido endometrial en forma de pólipos endometriales en la luz de los vasos linfáticos²². Dicha teoría se apoya en la presencia de endometriosis en vasos linfáticos demostrada en 6-7% de linfadenectomías y en la presencia de endometriosis en localizaciones poco comunes distantes del útero como hueso, pulmón y cerebro¹⁹.

La *teoría de células madre* sugiere que células madre extrauterinas originadas en la médula ósea como células mesenquimales, hematopoyéticas y precursores endoteliales pueden diferenciarse a tejido endometriósico. Esta teoría se sostiene por confirmación histológica de tejido endometriósico en pacientes sin endometrio menstrual, como en los casos de agenesias Mülllerianas²³ o endometriosis en hombres²⁴.

Según la *teoría de los restos Mülllerianos*, las células restantes de los conductos Mülllerianos embrionarios mantienen la capacidad de transformarse en lesiones endometriósicas bajo la influencia de ambiente hormonal estrogénico. Esta teoría se apoya en estudios que encuentran mayor número de endometriosis en mujeres expuestas a etinestilbestrol durante el período fetal²⁵.

A pesar de que la teoría de la menstruación retrógrada explicaría el desplazamiento físico de las lesiones, son necesarios unos pasos adicionales para explicar el desarrollo de implantes endometriósicos. Si la endometriosis se generara por el paso retrógrado del endometrio, serían necesarios los siguientes pasos para explicar el crecimiento y supervivencia de las lesiones, como escape al sistema inmune, adherencia al epitelio peritoneal, invasión del epitelio y establecimiento de neurovascularización. La predisposición genética, la inflamación, los factores ambientales, la influencia de estrógenos y la resistencia a la progesterona están también implicados en la patogénesis de endometriosis.

1.3 TIPOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE ENDOMETRIOSIS

La clasificación de endometriosis resulta controvertida debido a múltiples manifestaciones de la enfermedad y que ha ido cambiando en función de la distribución anatómica de las lesiones, de la histología, de los hallazgos quirúrgicos o del pronóstico de la enfermedad.

La clasificación más conocida es la revisada de la sociedad Americana de Medicina Reproductiva (r-ASRM) que describe la extensión, la profundidad y la localización de las lesiones²⁶. Esta clasificación utiliza un sistema de puntos que categoriza la enfermedad en estadíos I-IV: I (1-5 puntos), II (6-15 puntos), III (16-40 puntos) y IV (>40 puntos). Esta clasificación no se correlaciona con la severidad y la localización de la enfermedad, de manera que mujeres con estadío I pueden experimentar dolor severo y/o infertilidad, mientras mujeres con estadío IV pueden estar asintomáticas. Otra desventaja de esta clasificación es que tampoco contempla endometriosis de localización extrapélvica y es una clasificación quirúrgica.



AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

Patient's Name _____ Date _____
 Stage I (Minimal) - 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Stage II (Mild) - 6-15 Recommended Treatment _____
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - >40
 Total _____ Prognosis _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	<1cm	1-3cm	>3cm
		Superficial	1	2
	Deep	2	4	6
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial 4	Complete 40	
OVARY	ADHESIONS	<1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	>2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	TUBE	R Filmy	1	2
Dense		4*	8*	16
L Filmy		1	2	4
Dense		4*	8*	16

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.
 Denote appearance of superficial implant types as red [(R), red, red-pink, flamelike, vesicular blobs, clear vesicles], white [(W), opacifications, peritoneal defects, yellow-brown], or black [(B) black, hemosiderin deposits, blue]. Denote percent of total described as R___%, W___% and B___%. Total should equal 100%.

Additional Endometriosis: _____

 Associated Pathology: _____

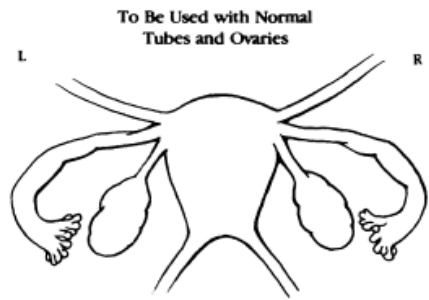











Figura 5. Clasificación revisada de endometriosis de la asociación americana de medicina reproductiva. Imagen de Revised American Society for Reproductive Medicine²⁶.

Para mejorar y suplementar las debilidades de la clasificación de r-ASRM, que son la localización, la severidad de endometriosis profunda y la correlación con el dolor, la Fundación Alemana de Investigación de endometriosis y grupo austriaco de trabajo en endometriosis publicaron en 2005 la clasificación de Enzian²⁷. Ésta fue revisada en 2010 y 2011 y es complementaria a la clasificación de r-ASRM. Esta clasificación no se basa en la puntuación sino en la descripción morfológica de las lesiones, incluyendo su tamaño y su ventaja es que es una clasificación clínica²⁸.

Pelvic compartment -ment Level	A rectovaginal space vagina	B sacrouterine ligaments cardinal ligaments, pelvic sidewall external ureter compression	C lower bowel rectum / sigmoid
1 <1cm	 A 1	 B 1	 C 1
2 1-3 cm	 A 2	 B 2	 C 2
3 >3cm	 A 3	 B 3	 C 3






FA uterine adenomyosis		FI intestine sigma, coecum, term. ileum	
FB bladder		FO other localisations Diaphragma,....	
FU intrinsic ureter			

Figura 6. Clasificación de Enzian revisada. Imagen de Haas D et al. ²⁸.

Otro sistema de clasificación que existe es el llamado índice de fertilidad en endometriosis (EFI)²⁹. EFI es otra clasificación complementaria a la de r-ASRM y es pronóstica en cuanto a fertilidad. Tiene en cuenta la función ovárica, tubárica y de fimbrias, así como la edad de la paciente, años de infertilidad y embarazos previos. A pesar de tener buena correlación con la tasa de embarazo espontáneo, es una clasificación quirúrgica que no contempla anomalías uterinas ni tiene correlación con la clínica³⁰.

Sin embargo, las clasificaciones actuales siguen siendo criticadas por pacientes y profesionales de la salud, porque ofrecen poca correlación con los síntomas, son poco predictivas en cuanto al pronóstico y poco claras en cuanto a tratamiento del dolor e infertilidad basadas en dichas clasificaciones.

La endometriosis pélvica tiene una presentación heterogénea que varía de endometriosis superficial a quistes endometriósicos ováricos (endometriomas) y a nódulos de más de 5 mm de profundidad (endometriosis profunda), que se pueden acompañar de fibrosis y adherencias. Tradicionalmente se reconocen estos 3 fenotipos de la enfermedad:

- Endometriosis superficial
- Endometriosis ovárica
- Endometriosis profunda

Según Nisolle et al en 1997³¹, en la endometriosis superficial existen similitudes morfológicas y morfométricas entre endometrio eutópico y lesiones peritoneales rojas, sugiriendo que estas lesiones son el primer paso de implantación de las glándulas y del estroma endometrial. Después de un vaciamiento parcial, estas lesiones vuelven a crecer. El vaciamiento provoca inflamación y formación de escaras, lo que hace que estas lesiones se vuelvan de color negro. La subsecuente fibrosis hace que estas lesiones se opacifiquen volviéndose de color blanco. La endometriosis superficial se caracteriza por pequeños focos de glándulas endometriales que se suelen depositar en superficies de órganos pélvicos o en peritoneo pélvico³². Estos pequeños depósitos están altamente vascularizados, pero el recurrente vaciamiento e inflamación los lleva a tener una

aparición de “polvo quemado” en la laparoscopia, siendo frecuentemente indetectadas en las pruebas de imagen.

Formaciones endometriósicas dentro del ovario se denominan endometriomas o “quistes de chocolate” por la presencia de sangre antigua que les da el aspecto y nombre característicos. La patogénesis de endometriosis ovárica sigue siendo controvertida, principalmente hay 3 teorías que la explican ³³:

1. Los endometriomas representan pseudoquistes formados por desechos acumulados de la menstruación y activación de las glándulas endometriósicas (“teoría de la invaginación”)
2. Los endometriomas aparecen por invaginación del epitelio celómico ovárico (“teoría de metaplasia celómica”)
3. Los endometriomas se originan a partir de folículos ováricos (“teoría folicular”)

Cuando los depósitos de endometriosis infiltran más de 5 mm en profundidad de cualquier localización se denominan endometriosis profunda. La distribución de las lesiones es similar a la de endometriosis superficial, en caso de endometriosis profunda existe asociada una marcada inflamación y fibrosis con proliferación de tejido liso muscular que da lugar a nódulos o masas sólidas en forma estrellada rodeada de glándulas de endometrio ectópico⁵. Las adherencias son el resultado de fibrosis y causan distorsión arquitectural y desplazamiento de estructuras. Cuando los ovarios se fusionan por el efecto de la endometriosis, su apariencia en las pruebas de imagen se denomina “kissing ovaries”. La endometriosis profunda es frecuentemente multifocal y principalmente afecta a las siguientes estructuras: ligamentos uterosacros, fondo de saco vaginal posterior, vejiga, uréteres y tracto digestivo (recto, unión recto-sigmoidea, apéndice).

No está claro si la endometriosis es una enfermedad que va progresando hacia las formas severas o las endometriosis peritoneal, ovárica y profunda son entidades diferentes y se deben considerar por separado.

Una reciente propuesta para la clasificación de endometriosis viene dada por Koninckx et al. (2010)³⁴ quienes añaden adenomiosis, lesiones de bolsillos peritoneales y endometriosis sutil a los 3 fenotipos tradicionalmente reconocidos, haciendo énfasis en el tamaño de las lesiones.

Por tanto, se han propuesto diversas clasificaciones de endometriosis basadas en que la endometriosis es una enfermedad progresiva y diseñadas en función de la severidad de las lesiones visibles. Ninguna de estas clasificaciones ha sido validada para predecir el diagnóstico, el pronóstico de la respuesta al tratamiento, la recurrencia, la progresión o la asociación con dolor e infertilidad. La dificultad de encontrar una clasificación radica en el desconocimiento de la patofisiología e historia natural de la enfermedad.

1.4. MANEJO TERAPEUTICO

Actualmente no existe un tratamiento causal de la endometriosis. Las opciones terapéuticas (tratamiento médico o quirúrgico) dependen de la elección informada de la mujer, de su edad, deseo de embarazo, tratamientos previos, naturaleza o gravedad de los síntomas, localización y gravedad de la enfermedad. Frecuentemente el manejo médico se ofrece en primer lugar, reservando la cirugía para casos resistentes o recurrentes.

1.4.1. Tratamiento médico

El tratamiento médico está dirigido a controlar el dolor y a suprimir el tejido endometriósico hormonalmente activo.

Medicamentos usados en endometriosis

- Hormonales
 - Anticonceptivos orales combinados
 - Anticonceptivos de progesterona
 - Oral o inyectable
 - Implante
 - DIU-LNG
 - Moduladores selectivos de receptores de progesterona
 - Mifepristona
 - Acetato de Ulipristal
 - Onapristona
 - Agonistas de la GnRH
 - Acetato de Leuprorelina
 - Nafarelina
 - Goserelina
 - Antagonistas de GnRH
 - Cetrorelix
- No hormonales
 - AINEs
 - Inhibidores de aromatasa
 - Danazol

Figura 7. Medicación utilizada en endometriosis. Adaptado de Rafique S et al.³⁵

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son frecuentemente la primera línea de manejo del dolor y dismenorrea asociados a endometriosis. Funcionan inhibiendo las enzimas COX1 y 2 y por tanto inhibiendo la función de las prostaglandinas, que resulta en disminución de la inflamación y por tanto del dolor. También se pueden utilizar antihiperalgésicos si existe la sospecha de dolor de origen neuropático (amitriptilina, duloxetina, gabapentina, pregabalina)

u opioides. Estos últimos se deben reservar a casos muy concretos, sobre todo aquellos que no han respondido a otras líneas de tratamiento³³.

La efectividad de los tratamientos hormonales se basa en suprimir la actividad endometrial y son recomendados porque reducen el dolor asociado a la enfermedad. El tratamiento debe ser elegido basándose en efectividad, contraindicaciones, efectos adversos a corto y largo plazo, coste, disponibilidad y deseo de la paciente. La terapia hormonal no está indicada en pacientes asintomáticas³⁶.

Los anticonceptivos orales combinados (ACO) reducen la dismenorrea, dispareunia y dolor pélvico crónico³⁷. Son efectivos porque inducen decidualización de tejido endometriósico y frenan la progresión de la enfermedad. Son la primera línea de tratamiento a largo plazo. Su efecto se empieza a notar a partir de los 6 meses del inicio del tratamiento y desaparece 6 meses después del cese del mismo. El tratamiento se puede administrar de forma cíclica o en pauta continua, esta última mejora el control del dolor, sobre todo en casos de dismenorrea³⁸. Este tipo de tratamiento también se puede administrar mediante anillo vaginal o parches transdérmicos. La dosis de etinilestradiol (20 µg vs 35 µg) no disminuye la eficacia del tratamiento, pero sí los efectos secundarios, por lo que se recomienda usar los ACO de menor dosis.

Los anticonceptivos que contienen solo progesterona actúan de manera similar induciendo la decidualización de endometrio que luego lleva a la atrofia de las lesiones endometriósicas. Algunas de las progesteras recomendadas para el tratamiento del dolor asociado a la endometriosis son el acetato de medroxiprogesterona (vía oral o depot), dienogest, acetato de ciproterona, acetato de noretisterona o danazol³⁶. El DIU-Levonorgestrel también es efectivo reduciendo el dolor tanto antes³⁷ como después de la cirugía³⁹. El implante de etonogestrel también es eficaz mejorando el dolor y la satisfacción de las pacientes³⁷.

Otra opción de tratamiento la constituyen los análogos de hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH) que producen un estado de hipoenestrogenismo profundo bloqueando la producción de estrógeno en los ovarios. Son una buena

opción para casos de fallo de ACO o mujeres con contraindicaciones para terapia hormonal o cirugía⁴⁰. Triptorelina mensual o trimestral inyectada y Nafarelina nasal son los análogos más utilizados en nuestro medio. Su uso está aprobado por un período máximo de 12 meses para evitar los efectos secundarios. Sin embargo, a partir de los primeros 6 meses se aconseja realizar la llamada “add-back” terapia, que normalmente incluye añadir estrógenos y progesterona, progesterona sola o Tibolona, para contrarrestar los efectos secundarios de los análogos.

Los antagonistas de hormonas liberadoras de gonadotropina es otro grupo terapéutico que de forma similar al anterior inducen hipoestrogenismo y mejoran el dolor, con la ventaja de evitar el efecto flare-up de los análogos y tener menos efectos adversos debido a la persistencia de la producción de niveles bajos de estrógenos⁴¹.

La aromatasa es una encima que convierte precursores esteroideos en estrógenos. Los medicamentos inhibidores de aromatasa reducen dicha producción de estrógenos y se reservan para el tratamiento del dolor en casos de endometriosis vaginal refractaria a otros tratamientos. Se deben prescribir con ACO, progesterona sola o análogos de GnRH.

Terapia con Danazol, que se considera un agente androgénico y actúa inhibiendo las gonadotropinas y por tanto disminuyendo niveles de estrógenos, es efectiva disminuyendo el dolor, pero está en desuso por sus efectos adversos.

Dado que la angiogénesis tiene un papel crucial en el crecimiento y supervivencia de las lesiones, los factores antiangiogénicos se han postulado como una posible diana terapéutica en pacientes con endometriosis. Los inhibidores de angiogénesis han demostrado utilidad en modelos animales, sin embargo, no tenemos datos de estudios en humanos. Dopamina y agonistas del receptor 2 de Dopamina actúan inhibiendo la angiogénesis, pero no hay suficientes estudios en humanos⁴². Las Estatinas también tienen un papel antiangiogénico y antioxidante, con buenos resultados en estudios in vitro y en animales, sin traslación clínica por el momento⁴³.

TNF- α es una citoquina proinflamatoria que está elevada en pacientes con endometriosis. Los inhibidores de TNF- α han demostrado efectividad en modelos animales, sin embargo, en un estudio en mujeres no se demostró efecto sobre el tamaño de las lesiones ni mejoría del dolor⁴⁴.

Tampoco hay evidencia suficiente para recomendar el uso de moduladores selectivos de receptores de estrógenos y/o progesterona. Antioxidantes como Pentoxifilina y N-Acetilcisteína, antidiabéticos y Resveratrol, entre otros, tienen resultados prometedores en estudios animales, pero no existe evidencia de su eficacia o seguridad en humanos.

1.4.2. Tratamiento quirúrgico

La técnica recomendada para el tratamiento de endometriomas es la quistectomía laparoscópica en lugar de drenaje y coagulación porque reduce el dolor asociado a endometriosis⁴⁵ y tiene menos riesgo de recurrencia que la vaporización con láser CO₂⁴⁶. Dado que esta técnica puede asociar disminución de reserva ovárica, se recomienda evaluar dicha reserva previamente a la cirugía y discutir las opciones de preservación de fertilidad con la paciente. Escleroterapia con etanol es otra posible técnica de tratamiento de los endometriomas que se relaciona con menor riesgo de recurrencia y mejor preservación de reserva ovárica⁴⁷. Se ha visto que la quistectomía de endometriomas > 4 cm mejora las tasas de fertilidad en comparación con la ablación⁴⁸.

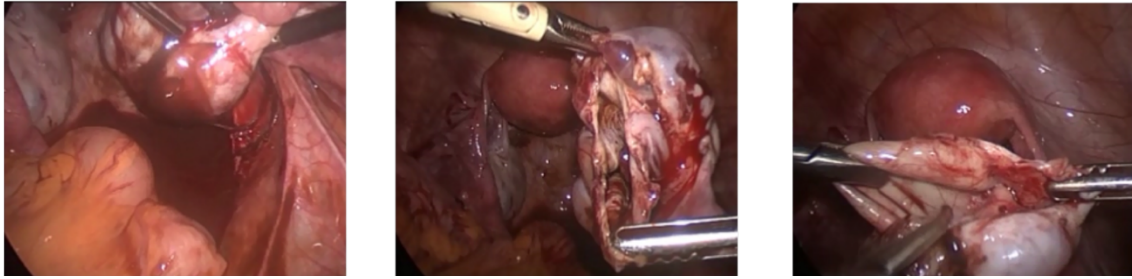


Figura 8. Quistectomía laparoscópica de endometrioma ovárico. L. Mañalich, Hospital Vall d'Hebron.

En cuanto al tratamiento de la endometriosis peritoneal, la cirugía de endometriosis mínima leve mejora el dolor a corto y medio plazos. No existen diferencias en cuanto a la efectividad del tratamiento entre la resección y la ablación de las lesiones⁴⁸. La endometriosis peritoneal detectada durante una cirugía tiene que ser tratada siempre y cuando sea posible, ya que puede tratarse de endometriosis profunda con apariencia externa de endometriosis superficial³⁶. En pacientes con este tipo de endometriosis e infertilidad, el tratamiento quirúrgico para mejorar únicamente las tasas de técnicas de fertilización in vitro (FIV) no está recomendado³⁷.

En los casos de endometriosis profunda puede haber 4 escenarios: endometriosis con infiltración vesical, endometriosis rectovaginal, endometriosis con extensión lateral con o sin compromiso ureteral y afectación sigmoidea. Excepto para la primera opción, donde la cistectomía parcial parece ser una técnica que mejora el dolor en las pacientes con endometriosis, que puede ser realizada por el ginecólogo, el resto de opciones requieren de un manejo multidisciplinar. Si existe afectación intestinal, las opciones de tratamiento quirúrgico incluyen el llamado “shaving rectal”, resección discoide anterior o resección y re-anastomosis. Los casos de endometriosis profunda con obstrucción intestinal y/o ureteral, precisan de resección y anastomosis, lo que conlleva un mayor riesgo de complicaciones⁴⁹. La cirugía de endometriosis profunda no está recomendada únicamente para mejorar las tasas de éxito de una técnica de reproducción in vitro y ante fallo de 1 o más FIV, se recomienda discutir la necesidad de cirugía con un comité multidisciplinar³⁷.

Cuando no existe deseo gestacional, la cirugía de endometriosis que incluya la resección de todas las lesiones de endometriosis asociada a histerectomía con o sin ooforectomía bilateral, reduce el riesgo de recurrencia. Hay que discutir la preservación de los ovarios con la paciente en función del riesgo de recurrencia y los efectos adversos de la menopausia. La terapia hormonal sustitutiva, que no está contraindicada en estos casos, no favorece el riesgo de recurrencia de endometriosis⁵⁰.

1.4.3. Fracaso del tratamiento médico

El tratamiento médico no erradica la enfermedad y va dirigido únicamente a disminuir los síntomas y a frenar la progresión de las lesiones⁵¹. Los tratamientos disponibles conllevan un estado de hipoestrogenismo y la consecuente amenorrea, lo cual tiene sus limitaciones. En primer lugar, dado que los tratamientos frenan la enfermedad, pero no la suprimen, los síntomas recurren después de discontinuar el tratamiento. Por otro lado, el hipoestrogenismo inducido tiene efectos secundarios indeseados y no es compatible con gestación, lo cual limita el uso de estas terapias en pacientes con deseo reproductivo. Además, los tratamientos hormonales proporcionan un buen control del dolor a largo plazo solamente en dos tercios de las pacientes, mientras que el tercio restante podría beneficiarse del tratamiento quirúrgico⁴⁰.

Según la revisión sistemática de Becker et al.⁵², de un cuarto a un tercio de las pacientes que está bajo tratamiento hormonal necesitan otros tratamientos por pobre respuesta o intolerancia. Sin embargo, en esta revisión sistemática, encuentran que del 5 % al 59% de mujeres tienen dolor tras la finalización del tratamiento. Además, del 15 al 19% no obtienen ninguna mejoría con el tratamiento médico. Incluso en aquellos casos que la terapia médica mejora los síntomas, la recurrencia de los mismos al cesar el tratamiento oscila entre un 17% y un 34%. En estos casos, por tanto, para mantener la respuesta terapéutica es necesario un tratamiento a largo plazo, que es limitado por efectos secundarios y mala tolerancia.

La endometriosis es una enfermedad crónica y las pacientes necesitan nuevas terapias médicas que, proporcionen mejoría de la progresión de la enfermedad, mejoría de la recurrencia de síntomas a largo en plazo y, que su efecto se mantenga después de discontinuar el tratamiento.

A su vez, la cirugía va dirigida a eliminar las lesiones visibles y a restaurar la anatomía, mejorando la sintomatología de las pacientes y a veces la fertilidad. Sin embargo, la cirugía no altera el mecanismo etiopatogénico de endometriosis, por tanto, la enfermedad puede recurrir después, en aproximadamente 40-50% de las pacientes. Además, existe el riesgo de que las lesiones subperitoneales pasen inadvertidas o que la cirugía sea incompleta, y, sobre todo, que las lesiones microscópicas no pueden ser tratadas. Por ello, es crucial prevenir la recurrencia de síntomas y lesiones después de una cirugía conservadora⁵³. Independientemente del tipo de la lesión y de la medicación, las pacientes que interrumpen el tratamiento tienen una mayor incidencia de recurrencia, lo que indica que el efecto de estos tratamientos desaparece rápidamente después del cese de la administración. Por ello, se recomienda el uso regular y prolongado de medicamentos hasta el momento del deseo de gestación para prevenir la recurrencia postoperatoria de endometriosis.

Sin embargo, la recurrencia de síntomas no siempre es sinónimo de recurrencia de la enfermedad, dado el alto riesgo de aparición de adherencias, la posibilidad de existencia de adenomiosis concomitante y la posibilidad de sensibilización central del dolor, lo que complica aún más el ya difícil manejo de endometriosis.

1.5 ALTA TASA DE RECIDIVAS

A pesar de la disponibilidad de tratamientos médicos y quirúrgicos, que puedan conllevar efectos secundarios sustanciales, no existe la cura definitiva de endometriosis. Los tratamientos se basan en reducir el dolor, aumentar las tasas de gestación y prevenir las recurrencias⁵⁴. Mujeres con endometriosis

frecuentemente presentan recurrencias y morbilidad prolongada debido a la enfermedad¹.

La tasa de recurrencia es variable, porque depende de la definición de la recurrencia, del tipo y de la severidad de endometriosis, del hospital donde se realiza el tratamiento y de la habilidad del cirujano. Las tasas de recurrencia del dolor son más altas que la recurrencia clínica debido a que existe poca correlación entre dichos síntomas con la presencia de enfermedad demostrable en pruebas de imagen. Esto justifica, que la decisión de repetir la cirugía se base en los síntomas más que en el tamaño de las lesiones observadas⁵⁵.

Se ha descrito una alta tasa de recidivas que oscila del 21,5 % a los 2 años al 40-50% a los 5 años⁵⁶. Las recidivas se explicarían por el crecimiento de lesiones endometriósicas residuales, crecimiento de lesiones microscópicas, desarrollo de nuevas lesiones o combinación de las 3 anteriores. Por contrapartida, no existen estudios con un seguimiento mayor a 5 años, por lo que se desconoce la tasa de recidivas por encima de este período. Aunque disponemos de datos relacionados con reintervención en un seguimiento a 10 años. Por ejemplo, la tasa global de reintervención a los 10 años es del 51%, la mitad de estas pacientes (46%) tendrán 1 reintervención, mientras que la otra mitad (56%) tendrán un promedio de 3 cirugías⁵⁷. Otros datos que apoyan la alta tasa de recidivas sitúan la probabilidad de reingreso y reintervención dentro de los primeros 4 años después de la primera cirugía en un 27% de los casos y 1 de cada 10 mujeres terminará con histerectomía⁵⁸. Otro dato que refleja el mismo problema de la recurrencia, es que alrededor del 50% de mujeres intervenidas por primera vez necesitan tratamiento analgésico y/o hormonal en los 2 primeros años postquirúrgicos⁴⁰.

La recurrencia, en particular de endometriomas, se sitúa entre un 10% en pacientes que reciben tratamiento hormonal postquirúrgico y un 40% en aquellas que no lo reciben⁵⁹. Sin embargo, la tasa global de recurrencia es de un 30 % a un 50 % a los 2-5 años de la cirugía⁵⁹. Por ello, se debería recomendar a las pacientes después de una quistectomía por endometriosis ovárica buscar

gestación inmediatamente después de la cirugía u ofrecer tratamiento hormonal hasta que haya deseo gestacional.

En cuanto a la tasa de recurrencia de endometriosis profunda, también es variable y depende de los años de seguimiento, de la definición de recurrencia, del tamaño de muestra y del grupo investigador, situándose entre un 2% y un 43%⁶⁰. Se han propuesto varios factores de riesgo para la recidiva de endometriosis profunda, entre ellos un elevado índice de masa corporal y edad joven al momento de la primera cirugía son los factores de más alto riesgo de recurrencia.

1.6. AGRESIVIDAD DE FORMAS PROFUNDAS

El endometrio eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis tiene unas características diferentes en comparación con el endometrio de pacientes sanas. Para que el endometrio pueda sobrevivir en localizaciones ectópicas, existe un aumento de la actividad antiapoptótica. Se ha demostrado que existe una sobreexpresión del gen antiapoptótico BCL-2 en endometrio ectópico y eutópico de las pacientes afectas⁶¹. La alteración del balance entre metaloproteinasas e inhibidores tisulares de metaloproteinasas es responsable de invasión celular en endometriosis¹⁶. Factores angiogénicos (factor de crecimiento de endotelio vascular, VEGF) y neurogénicos (factor de crecimiento nervioso, NGF) también están sobreexpresados en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis, para promover la neuroangiogénesis². Además, el factor nuclear κ B (NF- κ B) también está sobreexpresado en endometriosis y es responsable del ambiente proinflamatorio que acompaña a la enfermedad⁶².

La endometriosis profunda es la forma clínica más severa y compleja de la enfermedad, donde se observa una alteración aun mayor de los factores anteriormente comentados. Según el estudio de Tosti et al.⁶³ es la forma más agresiva porque existe una alteración crítica en la función hormonal (receptores de estrógeno y progesterona) y factores inmunológicos (macrófagos, células NK y linfocitos). Esta alteración se podría explicar por una apoptosis marcadamente

disminuida (por sobreexpresión de NF- κ B, BCL-2 y hormona antimülleriana), por el aumento de la capacidad proliferativa relacionada con el estrés oxidativo y por el aumento de la capacidad invasiva (metaloproteinasas) en endometriosis profunda en comparación con endometriosis superficial u ovárica. También existen datos de un aumento de la expresión de neuroangiogénesis (NGF, VEGF y molécula de adhesión intracelular) en genes responsables de endometriosis profunda en comparación con otros tipos de endometriosis.

Por todo ello, parece que la endometriosis profunda tiene unas características patogénicas peculiares, debido a que probablemente se trate de una entidad específica y que podría explicar la sintomatología más acusada que experimentan las pacientes con esta entidad.

1.7. BIOMARCADORES EN ENDOMETRIOSIS

Un biomarcador es una molécula biológica que se encuentra en la sangre u otros líquidos o tejidos del cuerpo y es un signo de un proceso normal o anormal, o de una afección o enfermedad. Se trata de una molécula bioquímica derivada del paciente, por tanto, individualmente específica, que puede ser usada para el diagnóstico, pronóstico o medición de respuesta al tratamiento⁵⁶.

Un test de cribado ideal debería ser fácilmente accesible, asequible, fiable, preciso y lo menos invasivo posible según la OMS (Organización Mundial de la Salud). Además, en ginecología, un biomarcador ideal es aquel que permanece estable durante el ciclo menstrual, no está influenciado por la terapia hormonal ni por la presencia de otras patologías ginecológicas. Hasta hace poco, el gold estándar para el diagnóstico de endometriosis ha sido la cirugía con visualización de lesiones y toma de biopsias. Un diagnóstico sin necesidad de cirugía reduciría el riesgo quirúrgico asociado a este procedimiento, aumentaría la accesibilidad al test diagnóstico y mejoraría los resultados del tratamiento. Esta necesidad de un test diagnóstico preciso y no invasivo continúa motivando la investigación en este campo. Se han evaluado múltiples marcadores como test diagnósticos de endometriosis, pero ninguno se ha podido implementar en la práctica clínica. Se

han analizado biomarcadores sanguíneos, urinarios, salivales, de fluido peritoneal y de endometrio eutópico en un alto número de estudios, sin ningún resultado convincente en cuanto al test diagnóstico de endometriosis.

La sangre es un recurso potencial de biomarcadores, ya que permite que se hagan determinaciones de forma repetida, es de fácil obtención y permite la utilización de medidas de alto rendimiento⁶⁴. Se trataría de un test mínimamente invasivo, fácilmente accesible, aceptable por las pacientes y que ofrece resultados rápidos y costo-efectivos en comparación con la cirugía. La desventaja de este test es que su fiabilidad depende de las técnicas del laboratorio y de los protocolos de control de calidad, además de que sus resultados pueden depender de la variación durante el ciclo menstrual⁶⁵. En una revisión Cochrane de Nisenblat et al. se incluyeron 141 estudios con un total de 122 biomarcadores sanguíneos analizados (factores angiogénicos y de crecimiento, marcadores de apoptosis, moléculas de adhesión celular, marcadores hormonales, de sistema inmune, marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo, microRNA, marcadores tumorales y otras proteínas)⁶⁵. Ningún biomarcador mostró la precisión suficiente para ser utilizado clínicamente como test diagnóstico o de cribado.

Para muchas enfermedades, la orina es la muestra más utilizada para obtener biomarcadores por su fácil accesibilidad y menor complejidad de su composición. Su obtención no es invasiva, puede ser recogida por la propia paciente y tiene mayor aceptación entre las mujeres, además de proporcionar, como la sangre, resultados más rápidos y más costo-efectivos que la cirugía, teniendo las mismas desventajas que las muestras de sangre⁶⁶. Liu et al., en la revisión Cochrane de 2015 incluyeron 8 estudios con 646 participantes, se evaluaron un total de 7 biomarcadores, entre ellos, enolasa 1, proteína de unión a vitamina D y citoqueratina 19. Ninguno de los biomarcadores reunió criterios para ser test diagnóstico o de cribado.

Aunque la biopsia endometrial es un método algo más invasivo que la sangre o la orina, su obtención en la consulta sin anestesia hace que sea una prueba poco o mínimamente invasiva y tiene la potencial ventaja de mejorar la especificad,

aunque los resultados de esta prueba pueden variar en función del ciclo menstrual y en función de otras enfermedades ginecológicas⁶⁴. Otras ventajas de utilizar la biopsia endometrial son su disponibilidad y el coste más bajo en comparación con cirugía. Es un test aceptable por las pacientes y suele dar resultados rápidos. Sin embargo, es un test dependiente de la persona que realiza la biopsia, del tipo de instrumento usado para el procedimiento, el tiempo de procesamiento de la muestra y, como las dos anteriores, depende de las técnicas del laboratorio y de los protocolos de control de calidad⁶⁷. En la revisión Cochrane de Gupta et al. 2016, se analizaron 54 estudios con un total de 22 marcadores diferenciales de endometriosis y otros 77 sin diferenciar entre mujeres con endometriosis y sanas. La conclusión de esta revisión sistemática es que el marcador neural PGP 9.5 sí que reúne criterios para ser un test diagnóstico, pero tiene mucha variabilidad entre estudios y otros marcadores tienen resultados prometedores, pero evidencia insuficiente para trasladarlo a la práctica clínica, por lo que concluyen que la laparoscopia debe seguir siendo el gold estándar para el diagnóstico de endometriosis.

La saliva es otro de los recursos más convenientes para la búsqueda de biomarcadores de enfermedades. Frecuentemente se usa para estudios de ADN. Un escobillón de saliva permitiría una rápida recogida de secreciones y células de forma no invasiva. De ahí se podrían rápidamente identificar, analizar y usar para el diagnóstico de la enfermedad marcadores genéticos o no genéticos (proteínas y hormonas). Su desventaja es que puede contaminarse con ADN de bacterias⁶⁸ y que sólo detecta hormonas libres no unidas a proteínas, obteniendo concentraciones relativamente bajas⁶⁹. Múltiples estudios han demostrado que la saliva es altamente comparable con sangre en cuanto a los biomarcadores genéticos⁶⁸, sin embargo, se necesitan más estudios para descubrir un biomarcador en saliva fiable⁷⁰.

El fluido peritoneal contiene una amplia variedad de macrófagos, linfocitos y células mesoteliales⁷¹. Estas células promueven un ambiente proinflamatorio debido a la alta concentración de citoquinas⁷², aunque no se sabe si es origen o consecuencia de endometriosis. Esta característica hace que el fluido peritoneal sea útil para diagnosticar, identificar dianas terapéuticas o monitorizar respuesta

al tratamiento en pacientes con endometriosis⁷⁰. La recogida del líquido peritoneal requiere cirugía, aunque también se podría recoger mediante punción y aspiración del fondo de saco de Douglas durante la realización de una ecografía transvaginal. Aunque en la literatura se han identificado muchos biomarcadores peritoneales, ninguno de ellos por sí solo ni en combinación con otros puede ser trasladado a la práctica clínica para el diagnóstico de endometriosis.

Para evaluar la precisión de cualquier combinación de los test no invasivos para el diagnóstico de endometriosis se ha realizado una revisión sistemática por Nisenblat et al⁷³. Esta revisión Cochrane incluye 11 estudios con 1339 pacientes y 12 combinaciones diagnósticas incluyendo biomarcadores sanguíneos, urinarios, endometriales, ecografía transvaginal, historia clínica y exploración física. La conclusión de estos autores, es que ninguno de los biomarcadores evaluados en esta revisión puede reemplazar la laparoscopia para el diagnóstico de endometriosis y el uso de los tests no invasivos debe limitarse de momento al campo de investigación.

A pesar de las diversas teorías acerca de la etiopatogenia de endometriosis (menstruación retrógrada, metaplasia celómica, metástasis linfáticas y hematógenas, teoría de células madre, etc.) el origen de la endometriosis sigue siendo incierto. Independientemente del origen, el proceso crítico de los implantes de endometriosis para su supervivencia es la vascularización. Muchos estudios se han centrado en demostrar el papel que la angiogénesis desempeña en endometriosis.

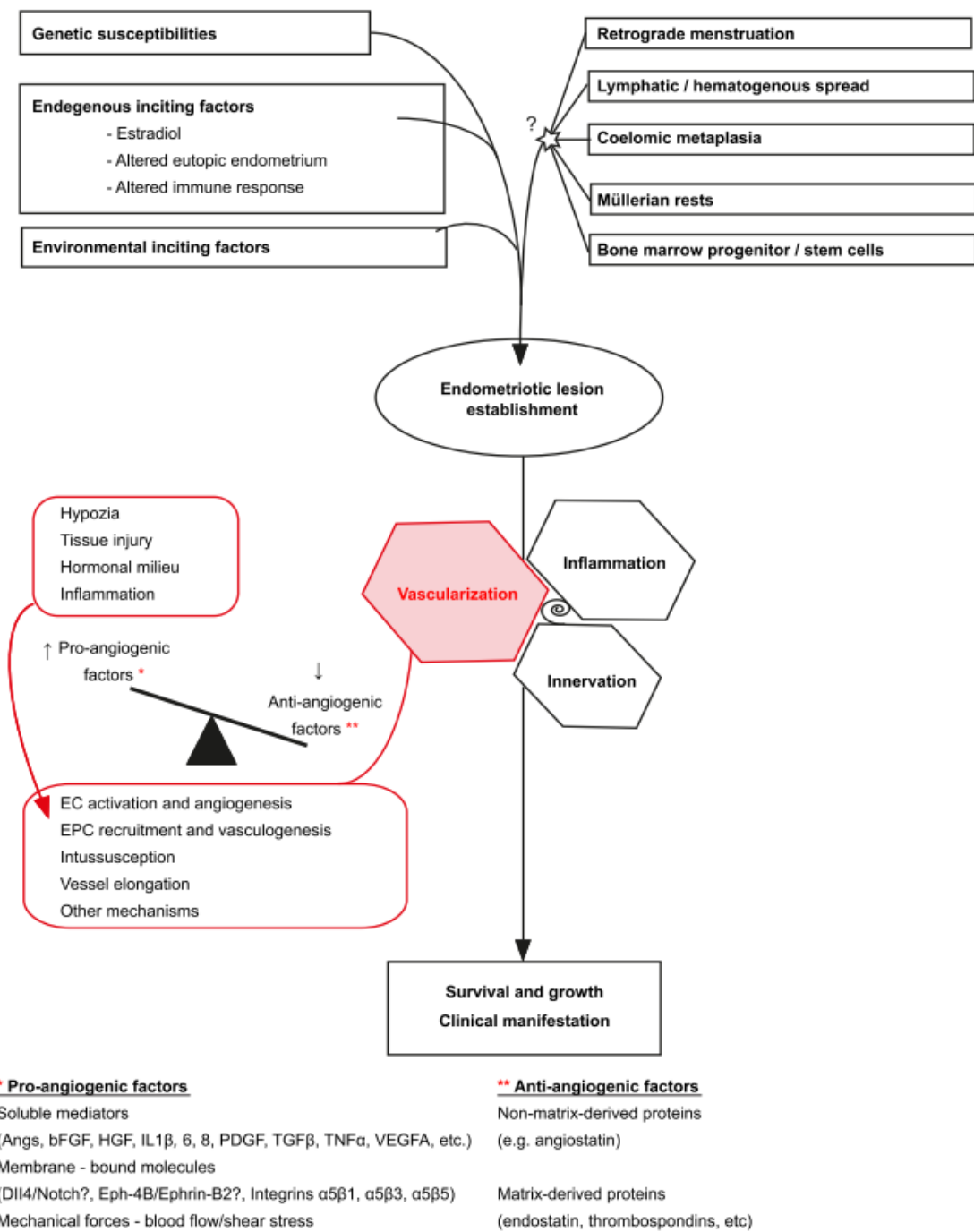


Figura 9. Neovascularización en la patogénesis de endometriosis. Imagen de Djokovic D et al.⁷⁴. Angs, angiopoyetinas; bFGF, factor básico de crecimiento de fibroblasto; HGF, factor de crecimiento hepatocitario; IL-1 β , 6, 8, interleuquinas 1 β , 6, 8; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; TGF- β , factor de crecimiento transformador β ; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; VEGF-A, factor de crecimiento de endotelio vascular A; DII4, receptor delta-like 4

Está ampliamente demostrado el papel de factores angiogénicos en endometriosis^{22,74-76}. Hasta la fecha se han analizado múltiples factores angiogénicos, como factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF),

receptor soluble de VEGF llamado tirosina quinasa 1 soluble tipo fms (sFlt-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), receptores 2 y 3 de VEGF (VEGFR-2 y 3), factor de crecimiento placentario (PIGF), interleuquina 8, citoquinas, etc.

El factor de crecimiento placentario (PIGF), tirosina quinasa 1 soluble tipo fms (sFlt-1) y la Endogлина soluble (s-Eng) han sido ampliamente estudiados en otras enfermedades angiogénicas como es la preeclampsia y el resultado de dicha investigación ha derivado en su uso como biomarcadores circulantes diagnósticos en mujeres embarazadas⁷⁷⁻⁸⁰. VEGF es el factor angiogénico más ampliamente estudiado con resultados contradictorios⁸¹⁻⁸³. PIGF, cuyo efecto biológico es mediado por VEGFR-1⁸⁴, contribuye en preeclampsia y en formación de metástasis en cáncer. En endometriosis, Suzumori et al.⁸⁵ y Zucchini et al.⁸⁶ han demostrado niveles más aumentados de PIGF en líquido peritoneal y en sangre periférica de pacientes con endometriomas. La correlación entre VEGFR y endometriosis aún no ha sido determinada. VEGFR incluye 3 receptores transmembrana de tipo tirosin quinasa: VEGFR-1 o Flt1, VEGFR 2 y 3, sus niveles están significativamente elevados en endometrio eutópico de pacientes con endometriosis⁸⁷. Estos receptores también existen en formas solubles (como por ejemplo sVEGFR-1, también llamado s-Flt-1) y pueden ser cuantificados en líquido peritoneal, sangre periférica⁸⁸ y otros tejidos. Los receptores solubles ejercen un efecto regulador negativo sobre VEGF, por tanto, disminuyendo la actividad angiogénica⁸⁸. Bourlev et al.⁸⁹ mostraron en su estudio aumento de niveles de VEGF-A, sVEGFR-1 y angiogenina en suero y en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis respecto a controles. El cociente sVEGFR/VEGF-A está bajo en paciente con endometriosis respecto a los controles. Sin embargo, después de la cirugía, la concentración de VEGF-A baja y la de sVEGFR-1 sube, lo que hace que el cociente se mantenga alto en pacientes intervenidas de endometriosis respecto a los controles. Estos resultados difieren del estudio de Cho et al.⁹⁰ donde no encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de VEGF y sFlt-1 en pacientes con endometriosis, ni tampoco en el cociente de estos factores. Niveles más altos de sFlt-1 fueron hallados en suero de pacientes con endometriosis mínima-moderada respecto a moderada-severa.

La expresión de endoglina está aumentada en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis⁹¹, sin embargo, su forma soluble aún no está descrita en dicha enfermedad. Estableciendo el paralelismo con preeclampsia donde dicho factor está ampliamente estudiado y está demostrado que sus niveles aumentan en sangre periférica en pacientes con preeclampsia⁹² se podría realizar la determinación de este factor para ver su comportamiento en endometriosis.

1.8. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las recientes revisiones Cochrane concluyen que a pesar de la existencia de biomarcadores prometedores no existe un marcador sólo o combinación de ellos para el diagnóstico, pronóstico o monitorización de tratamiento que sean clínicamente relevantes en endometriosis. Esto es un reflejo de los problemas relacionados con la investigación en endometriosis que son: interpretación de datos, estudios con muestras pequeñas, falta de validación de datos y sobre todo gran heterogeneidad entre estudios².

Hasta hace poco, el gold estándar para su diagnóstico ha sido la cirugía laparoscópica para visualización de lesiones y toma de biopsias. Sin embargo, la cirugía es un método invasivo que no está exento de riesgos. Por esta razón, existe un creciente número de grupos expertos en el manejo de endometriosis que abogan por un movimiento hacia técnicas menos invasivas, dejando la laparoscopia para casos en los que hay discrepancia entre los síntomas de la paciente y pruebas diagnósticas. Por todo ello, esta situación refleja la creciente necesidad de desarrollar herramientas precisas y no invasivas, para detectar la enfermedad precozmente y, si fuera posible, identificar parámetros pronósticos y de alto riesgo de recidiva para un manejo más óptimo de las pacientes.

El descubrimiento de un biomarcador no invasivo o de una combinación de ellos aceleraría el diagnóstico de endometriosis, disminuiría la necesidad de cirugía y por tanto de la morbilidad asociada a ella, permitiría una monitorización no invasiva y podría abrir nuevas vías terapéuticas. Además, podría evaluar el

riesgo de recurrencia, facilitando estrategias de prevención secundaria y podría influenciar sobre las decisiones clínicas relacionadas con fertilidad.

Existe una fuerte evidencia que la angiogénesis juega un papel fundamental en la patogénesis de endometriosis, siendo crucial para la aparición, mantenimiento y progresión de las lesiones endometriósicas. Estudios sobre el papel de diferentes factores angiogénicos en endometriosis y su uso como biomarcadores están en discordancia. La endoglina soluble (sEng), tirosina quinasa 1 tipo fms (sFlt-1) y el factor de crecimiento placentario (PIGF), han sido ampliamente estudiados en otras enfermedades angiogénicas como es la preeclampsia y el resultado de dicha investigación ha derivado en su uso como biomarcadores circulantes diagnósticos en mujeres embarazadas. Además, estudios recientes sugieren la existencia de niveles elevados de PIGF en fluido peritoneal y sangre periférica de pacientes con endometriosis. Por otro lado, existe controversia sobre los niveles de sFlt-1 y Eng en pacientes con endometriosis, mientras que, s-Eng no ha sido evaluada hasta ahora en esta enfermedad. Existe, por tanto, la necesidad de una investigación detallada de estos factores angiogénicos para entender su potencial uso como herramienta diagnóstica no invasiva y una potencial diana terapéutica. Para ello creemos que será de utilidad para ayudar a comprender la fisiopatología subyacente, comparar el comportamiento de factores angiogénicos Eng, sFlt-1 y PIGF a nivel de tejido endometriósico de diversas localizaciones. Esperamos encontrar concentraciones diferentes de Eng, sFlt-1 y PIGF en pacientes con endometriosis respecto a controles, así como entre diferentes formas de endometriosis (ovárica vs profunda), en tejido endometriósico, endometrio eutópico y en plasma.

El descubrimiento de un biomarcador en endometriosis supone un reto, ya que muchos grupos han intentado desarrollar un biomarcador patognomónico para esta enfermedad, sin obtener resultados aplicables en la clínica. Nuestro enfoque abre nuevas posibilidades de identificación de un kit de biomarcadores angiogénicos para el diagnóstico y pronóstico de endometriosis, aun así, serán necesarios en el futuro estudios de validación para su implementación en la práctica clínica.

2. HIPÓTESIS

La angiogénesis parece tener un papel importante en la patogénesis de la endometriosis. Varios factores angiogénicos han sido descritos en diversos estudios y varias patologías, entre ellas hipertensión pulmonar, fallo cardíaco, gestación ectópica, preeclampsia y endometriosis, para esta última con resultados contradictorios y sin traslación clínica por el momento. Entre dichos factores se encuentran la endoglina (soluble o unida a la membrana (Eng)), tirosina quinasa 1 tipo fms (sFlt-1) y factor de crecimiento placentario (PIGF). Recientemente dichos factores están siendo utilizados para el diagnóstico y pronóstico de preeclampsia y se pretende analizar su utilidad diagnóstica y pronóstica en la endometriosis. El paralelismo entre las dos enfermedades se establece por la etiopatogenia subyacente que podría ser común para las dos entidades, la angiogénesis alterada. En la preeclampsia predomina un estado anti-angiogénico, mientras que en la endometriosis se cree que hay un estado con tendencia pro-angiogénica, debido al aumento de vascularización necesaria para el crecimiento y supervivencia de las lesiones.

Actualmente existen pocos datos acerca del papel etiopatogénico de Eng, sFlt-1 y PIGF en la aparición y progresión de la enfermedad y este papel sigue siendo materia de estudio. Nuestro propósito consiste en evaluar el comportamiento de Eng, sFlt-1 y PIGF en plasma, aspirado endometrial y tejido endometriósico de pacientes con endometriosis para compararlo con controles. La hipótesis del estudio actual es evaluar el ambiente angiogénico en endometriosis y evaluar el potencial diagnóstico y pronóstico de estos factores.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal. Analizar el uso potencial de factores angiogénicos, especialmente (s)Eng, sFlt-1 y PIGF como biomarcadores moleculares para el diagnóstico poco invasivo de endometriosis.

- 1.1. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis para identificar su potencial como biomarcadores diagnósticos
- 1.2. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado uterino de pacientes con endometriosis para identificar su potencial como biomarcadores diagnósticos

Objetivos secundarios. Analizar el uso potencial de factores angiogénicos, especialmente (s)Eng, sFlt-1 y PIGF como biomarcadores moleculares para pronosticar la localización y la recurrencia de endometriosis.

- 2.1. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis para identificar diferentes localizaciones de endometriosis en función de la expresión de los factores angiogénicos
- 2.2. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis para identificar su potencial como biomarcadores pronósticos de recurrencia
- 2.3. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado uterino de pacientes con endometriosis para identificar diferentes localizaciones de endometriosis en función de la expresión de los factores angiogénicos

- 2.4. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en aspirado uterino de pacientes con endometriosis para identificar su potencial como biomarcadores pronósticos de recurrencia
- 2.5. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes con endometriosis para analizar el papel de la angiogénesis en endometriosis
- 2.6. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes con endometriosis para identificar su potencial como biomarcadores pronósticos de recurrencia

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO

Se trata de un estudio prospectivo de casos y controles. La recogida de pacientes y muestras se ha llevado a cabo entre los años 2014 y 2020. Las muestras biológicas incluidas en el estudio están recogidas en la colección de muestras del biobanco de tejidos de HUVH con el número C.0005152. Para este trabajo se obtuvo la aprobación número PR(AMI)374-2017 del comité ético del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Todas las participantes en el estudio han sido informadas y han firmado el consentimiento informado para la obtención y almacenamiento de muestras biológicas. El estudio se ha llevado a cabo en las instalaciones de HUVH y VHIR.

Para alcanzar los objetivos, el proyecto se ha dividido en 3 bloques (bloque 1, 2 y 3). Se ha contado con la participación de 180 pacientes, 77 en el grupo de endometriosis y 103 en el grupo control. Para el análisis de recidivas, se ha definido como no recidiva o episodio primario la primera cirugía completa por endometriosis, mientras que, se consideró como endometriosis recurrente la subsecuente cirugía por endometriosis hasta 4 años después de la cirugía previa y completa por endometriosis. En la figura 10 se muestra el diagrama de flujo de las participantes en el estudio y a continuación, se describen las participantes y las actividades realizadas en cada bloque.

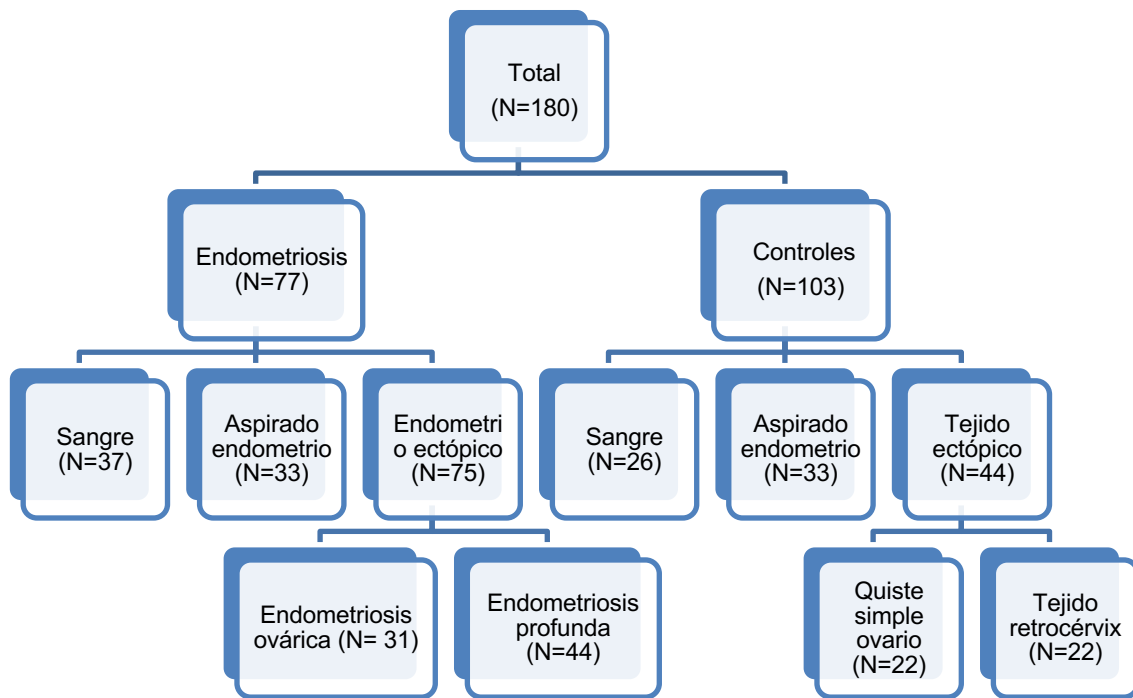


Figura 10. Diagrama de flujo de las participantes en el estudio.

4.2. BLOQUE 1. Responde los objetivos 1.1. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis para identificar potenciales biomarcadores diagnósticos; 2.1. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis para identificar diferentes localizaciones de endometriosis en función de la expresión de los factores angiogénicos y 2.2. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis para identificar posibles biomarcadores pronósticos de recurrencia.

4.2.1. Participantes

Para este análisis se compararon factores angiogénicos en plasma de 37 pacientes con endometriosis con 26 pacientes controles. Pacientes con endometriosis, mujeres entre 18 años y hasta la menopausia, diagnosticadas de endometriosis con confirmación histológica de la enfermedad. 18 de ellas fueron diagnosticadas de endometriosis profunda, mientras que las 19 restantes tuvieron endometriosis ovárica. En el grupo control se incluyeron 26 pacientes

sanas. Para ello se escogieron pacientes de sexo femenino provenientes de la unidad de cirugía ginecológica mínimamente invasiva del Hospital Universitario Vall d'Hebron, con la edad comprendida entre los 18 años y hasta la menopausia, que fueron intervenidas de esterilización tubárica por deseo de esterilización definitiva. Durante la cirugía se confirmó ausencia de endometriosis. En las tablas 1 y 2 se especifican los criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de plasma en pacientes con endometriosis y controles.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sexo femenino ✓ Edad fértil (>18 años – menopausia) ✓ Cirugía por su enfermedad de base ✓ Confirmación intraquirúrgica de endometriosis ✓ Aceptan participar y firman consentimiento informado 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <18 años o menopáusicas ✓ Proceso neoplásico activo ✓ Embarazo ✓ Ausencia de tejido endometriósico en las muestras extraídas ✓ Rechazan participar en el estudio ✓ Intervenidas recientemente

Tabla 1. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de plasma las pacientes con endometriosis.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sexo femenino ✓ Edad 18 años – menopausia ✓ Cirugía por su condición de base ✓ Confirmación intraquirúrgica de ausencia de endometriosis 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <18 años o menopáusicas ✓ Proceso neoplásico activo ✓ Embarazo ✓ Historia previa o evidencia de endometriosis durante la cirugía ✓ Antecedente de cirugía reciente

Tabla 2. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de plasma en pacientes control.

4.2.2. Recogida de muestras de sangre

La recogida de muestras se realizó antes del inicio de la cirugía, normalmente coincidiendo con el momento previo a la inducción anestésica. Aprovechando la venoclisis que es mandatoria para la inducción anestésica se obtenían 10 mL de sangre en un tubo de EDTA K2 (referencia de Vall d'Hebron 367525) o K3 (indistintamente). Se procedía a la inversión del tubo 10 veces después de la recogida de sangre para evitar la coagulación de la muestra. Las muestras se almacenaban a temperatura ambiente o en nevera hasta ser procesadas. El procesamiento de las muestras se realizaba dentro de las primeras 24 horas desde la recogida.

4.2.3. Procesamiento de muestras de sangre

1. Adición de inhibidor de proteasa a cada muestra (dilución 1:200)
2. Centrifugado a 1300 g durante 15 minutos a temperatura ambiente.

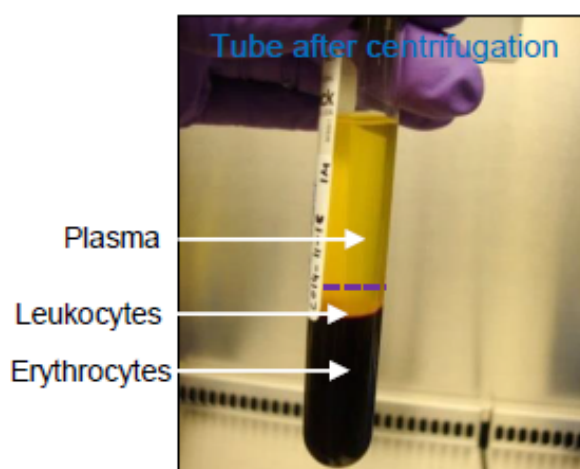


Figura 11. Fracciones sanguíneas después del centrifugado

3. Transferencia de toda la fracción soluble (sobrenadante - SN) a un nuevo tubo de Eppendorf.
4. Centrifugado de los tubos de Eppendorf con la fracción soluble (SN) a 3000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Transferencia de SN a nuevos tubos de Eppendorf y deshecho de la fracción precipitada.

6. Marcaje de ambos Eppendorf con el segundo SN y almacenaje a -80°C .

4.2.4. Determinación de factores angiogénicos en sangre. ELISA.

Para este proyecto la medición de los niveles de factores angiogénicos en sangre (sEng, sFlt-1 y PlGF) se realizó mediante kits ELISA comercializados (#DY1097, #DY321B, and #DY264; R&D system) según las instrucciones del fabricante. Todos los análisis se hicieron por duplicado y la densidad óptica fue leída a 450 nm de longitud de onda utilizando un lector de microplacas (BioTek, USA).

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) es una técnica que se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, esta reacción genera un cambio de color o emisión de luz que se puede cuantificar y es proporcional a la intensidad de la interacción. Generalmente se llevan a cabo en placas de 96 pocillos, lo que permite medir múltiples muestras en un único experimento. Cada prueba mide un antígeno específico, existiendo una gran variedad de kits disponibles para distintos antígenos. Las muestras suelen hacerse por duplicado para garantizar el análisis estadístico y en distintas concentraciones para garantizar que puedan ser medidos con los niveles de detección de la prueba.

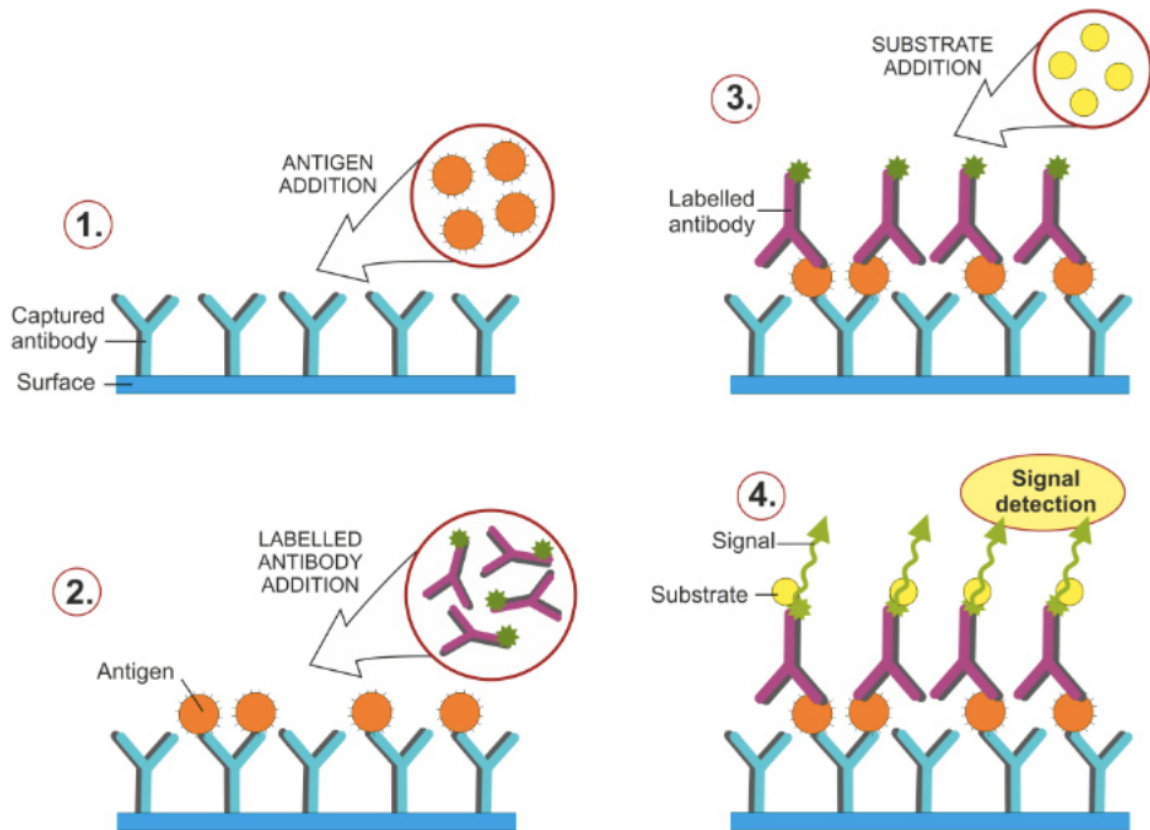


Figura 12. Reacción ELISA tipo Sándwich. Imagen de <https://www.biotek.com/applications/elisa-and-related-immunoassays.html>

En la figura 12 se muestra un tipo de ELISA llamado Sándwich. En primer lugar, a la placa de ELISA se añade el anticuerpo de captura. Este anticuerpo está diseñado para reconocer un determinado antígeno a estudio. Se añade la muestra (que es la que contiene los antígenos a estudio) y se produce la unión de antígeno anticuerpo. Posteriormente, se añade el anticuerpo de detección, que suele estar marcado con una enzima, generalmente peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. El anticuerpo marcado se une al antígeno que previamente se unió al anticuerpo de captura. Por último, con la adición de sustrato se produce una señal que puede estimarse mediante fluorimetría, luminometría o colorimetría utilizando un lector de placas. Por tanto, la concentración del antígeno en la muestra se calcula midiendo su densidad óptica y se compara con una curva estándar obtenida a partir de antígenos con concentración conocida.

4.3. BLOQUE 2

Responde los objetivos: 1.2. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado uterino de pacientes con endometriosis para para identificar potenciales biomarcadores diagnósticos; 2.3. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado uterino de pacientes con endometriosis para identificar diferentes localizaciones de endometriosis en función de la expresión de los factores angiogénicos y 2.4. Analizar la expresión de sEng, sFlt-1 y PIGF en aspirado uterino de pacientes con endometriosis para identificar posibles biomarcadores pronósticos de recurrencia

4.3.1. Participantes

De las pacientes con endometriosis se obtuvieron 33 muestras de aspirado endometrial. Dichas muestras fueron analizadas y comparadas con 33 aspirados de grupo control. Para ello se escogieron pacientes de sexo femenino provenientes de la unidad de cirugía ginecológica mínimamente invasiva del Hospital Universitario Vall d'Hebron, con la edad comprendida entre los 18 años y hasta la menopausia, que fueron intervenidas de histeroscopia quirúrgica para estudio endometrial por sospecha de cualquier lesión endometrial que posteriormente se descartó después del análisis anátomo-patológico. Las pacientes de grupo control no tenían historia de endometriosis ni antecedente de infertilidad o dolor pélvico crónico, que pudieran indicar sospecha de endometriosis.

En las siguientes tablas 3 y 4 se especifican los criterios de inclusión-exclusión para para la recogida de muestras de aspirado endometrial en pacientes con endometriosis y controles.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sexo femenino ✓ Edad fértil (>18 años – menopausia) ✓ Cirugía por su enfermedad de base ✓ Confirmación intraquirúrgica de endometriosis ✓ Aceptan participar y firman consentimiento informado 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <18 años o menopáusicas ✓ Proceso neoplásico activo ✓ Embarazo ✓ Ausencia de tejido endometriósico en las muestras extraídas ✓ Rechazan participar en el estudio ✓ Intervenidas recientemente

Tabla 3. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de aspirado endometrial en pacientes con endometriosis.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sexo femenino ✓ Edad 18 años – menopausia ✓ Histeroscopia por sospecha de patología endometrial ✓ Confirmación histopatológica de ausencia de patología endometrial 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <18 años o menopáusicas ✓ Proceso neoplásico activo ✓ Embarazo ✓ Antecedente o historia clínica sugestiva de endometriosis ✓ Antecedente de cirugía reciente

Tabla 4. Criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras de aspirado endometrial en pacientes control.

4.3.2. Recogida de muestras de aspirado endometrial

La recogida de muestras de pacientes con endometriosis se realizó antes del inicio de la cirugía, coincidiendo con el momento previo al inicio de la cirugía. Aprovechando la colocación de movilizador uterino, necesario para llevar a cabo el procedimiento se obtenía la muestra de aspirado uterino mediante cánula de Cornier o Pipelle. El aspirado endometrial se transfería a un tubo Eppendorf de 1.5ml sin añadir ninguna solución al interior del tubo. Las muestras se almacenaban a 4°C hasta su procesamiento, que no superaba las 2 horas desde la extracción de dicha muestra.

Para las pacientes del grupo control, las muestras fueron cogidas en el momento de realizar el procedimiento quirúrgico. Dichas muestras se incluyeron en formol y fueron parafinadas y almacenadas de manera habitual, realizándose el análisis anátomo-patológico. Una vez hecho este análisis y sin interferir en el proceso diagnóstico, el sobrante de las muestras fue almacenado en el banco de tejidos para su posterior uso, entre ellos, para nuestro estudio de factores angiogénicos.

El posterior procesamiento de las muestras almacenadas se describe en los puntos **4.5-4.7.**

4.4. BLOQUE 3

Responde a los objetivos 2.5. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes con endometriosis para analizar el papel de la angiogénesis en endometriosis y 2.6. Analizar la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes con endometriosis para identificar posibles biomarcadores pronósticos de recurrencia

4.4.1. Participantes

En este bloque se han comparado las muestras de tejido endometriósico de 75 pacientes con endometriosis con 44 muestras de tejido del grupo control. Concretamente, para el grupo control se utilizó tejido de cistoadenomas ováricos (N=22) que se comparó con endometriosis ovárica (N=31), mientras el tejido procedente de retrocervix (N=22) se utilizó como controles para la endometriosis profunda (N=44). Algunas de las pacientes con endometriosis tuvieron recurrencia de la enfermedad y fueron intervenidas en varias ocasiones, por lo que disponemos de diferentes muestras de tejido de una misma paciente. De esta forma, obtuvimos 92 muestras de tejido de 75 pacientes con endometriosis (54 muestras de endometriosis profunda y 38 de endometriosis ovárica). Para el grupo control se escogieron pacientes de sexo femenino provenientes de la unidad de cirugía ginecológica mínimamente invasiva del Hospital Universitario Vall d'Hebron, con la edad comprendida entre los 18 años y hasta la menopausia, que fueron intervenidas por proceso ginecológico benigno sin tener otra enfermedad y con confirmación intraquirúrgica de ausencia de endometriosis. En la tabla 5 se muestran los criterios de inclusión-exclusión para la recogida de muestras control de tejido endometriósico.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">✓ Sexo femenino✓ Edad 18 años – menopausia✓ Cirugía por condición ginecológica benigna✓ Confirmación intraquirúrgica de ausencia de endometriosis	<ul style="list-style-type: none">✓ <18 años o menopáusicas✓ Proceso neoplásico activo✓ Embarazo✓ Presencia de endometriosis en las muestras extraídas✓ Antecedente de cirugía reciente

Tabla 5. Criterios de inclusión-exclusión para para la recogida de muestras control de tejido endometriósico.

4.4.2. Recogida de muestras de tejido endometriósico

Las muestras fueron obtenidas en el momento de realizar el procedimiento quirúrgico. Dichas muestras se incluyeron en formol y fueron parafinadas y almacenadas de manera habitual, realizándose el análisis anátomo-patológico y confirmándose la presencia de endometriosis. Una vez hecho este análisis y sin interferir en el proceso diagnóstico, el sobrante de las muestras fue almacenado en el banco de tejidos para su posterior uso, entre ellos, para nuestro estudio de factores angiogénicos.

En el caso tejido control para las endometriosis profundas se utilizó tejido retrocervical o ligamentos uterosacros. Para ello, las piezas de histerectomía se remitían marcadas con un punto de sutura en su parte posterior para identificar los ligamentos uterosacros o la cara posterior del cérvix (como se indica en la Figura 12). En Anatomía Patológica se incluía un bloque con tejido marcado con el punto de sutura.

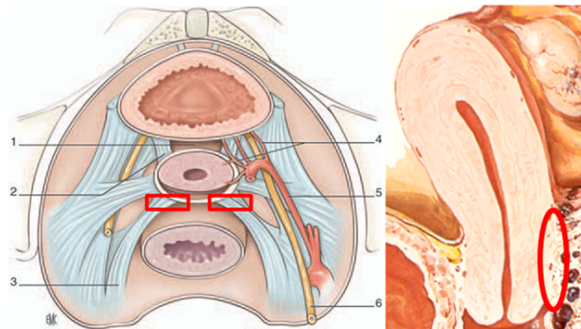


Figura 13. Región anatómica de obtención de la muestra de ligamento uterosacro

4.4.3. Procesamiento de muestras de tejido endometriósico

El posterior procesamiento de las muestras almacenadas se describe en los puntos **4.5-4.7.**

4.5. EXTRACCIÓN DE RNA

El estudio de la expresión de genes de Eng, sFlt-1 y PlGF se realizó mediante PCR cuantitativa. Para ello previamente hay que extraer el RNA de las muestras, que a grandes rasgos consiste en disrupción y homogeneización de muestras. Mediante la disrupción se produce la rotura de estructuras celulares, las paredes celulares y las membranas, liberando así el RNA contenido en las muestras. La homogeneización reduce la viscosidad de las muestras para facilitar la purificación de RNA. El siguiente paso consiste en aislar y purificar el RNA, para eliminar los posibles contaminantes de la muestra. Asimismo, es necesario eliminar el DNA genómico que puede ser otro contaminante de las muestras.

4.5.1. Tejido parafinado

En primer lugar, se delimita la zona de tejido parafinado que quiere ser estudiada y se selecciona mediante corte (Figura 14). El RNA y las proteínas de este tejido se extrajeron mediante el kit High Pure FFPE RNA Isolation Kit. En primer lugar, se realiza una desparafinación de los rollitos mediante lavados con Xileno y etanol. Posteriormente se utiliza proteinasa K para digestión inicial de la muestra, seguido de una segunda digestión con DNasa y una serie de lavados con un eluido final en agua. El proceso de purificación se realiza por método de columnas.

El protocolo empleado es el que sigue:

1. Para desparafinar las muestras se usan tubos de Eppendorf de 1,5 ml. Añadir 800 μ l de Xileno por cada rollito del tejido y agitar en vórtex brevemente en varios intervalos.
2. Añadir 400 μ l de etanol al 100% y vortear brevemente. Centrifugar durante 2 minutos a temperatura ambiente a velocidad máxima (16000xg), desechar el sobrenadante intentar no tocar el precipitado.

3. Añadir 1 ml de etanol (100%) y vortear la muestra. Centrifugar durante 2 minutos a temperatura ambiente y velocidad máxima (16000xg), y desechar el sobrenadante, intentar no tocar el precipitado. Sacudir el tubo Eppendorf sobre papel para eliminar residuos de etanol.
4. Colocar el tubo Eppendorf en una estufa a 55°C con la tapa abierta para completar la evaporación del etanol.
5. Añadir 100 µl de Tampón de Lisis Tisular de RNA, 16 µl 10% SDS y 40 µl de proteinasa K
6. Vortear e incubar 30 minutos a 85°C agitando a 600 rpm
7. Vortear brevemente y enfriar por debajo de 55°C
8. Añadir 80 µl de proteinasa K
9. Vortear e incubar 30 minutos a 55°C agitando a 600 rpm, el lisado al final del proceso debe ser transparente. Si hay permanencia de partículas, extender el incubado 10 minutos más.
10. Vortear y pipetear el lisado al reservorio de arriba del tubo (High Pure Filter Tube). Centrifugar a 6000xg durante 30 segundos.
11. Con un nuevo tubo colector centrifugar 2 minutos a 16000xg para secar el filtro.
12. Añadir 100 µl de solución de DNasa sobre el filtro (High Pure Filter).
13. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente
14. Añadir 500 µl de Tampón de lavado I
15. Centrifugar a 6000xg durante 20 segundos. Desechar el líquido.
16. Añadir 500 µl de Tampón de lavado II
17. Centrifugar a 6000xg durante 20 segundos. Desechar el líquido
18. Añadir 500 µl de Tampón de lavado II
19. Centrifugar a 6000xg durante 20 segundos. Desechar el líquido
20. Centrifugar 2 minutos a 16000xg para secar el filtro. Colocar dicho filtro en un tubo nuevo de Eppendorf de 1.5 ml.
21. Añadir 25-50 µl de Tampón de eluido.
22. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 6000xg durante 1 minuto.

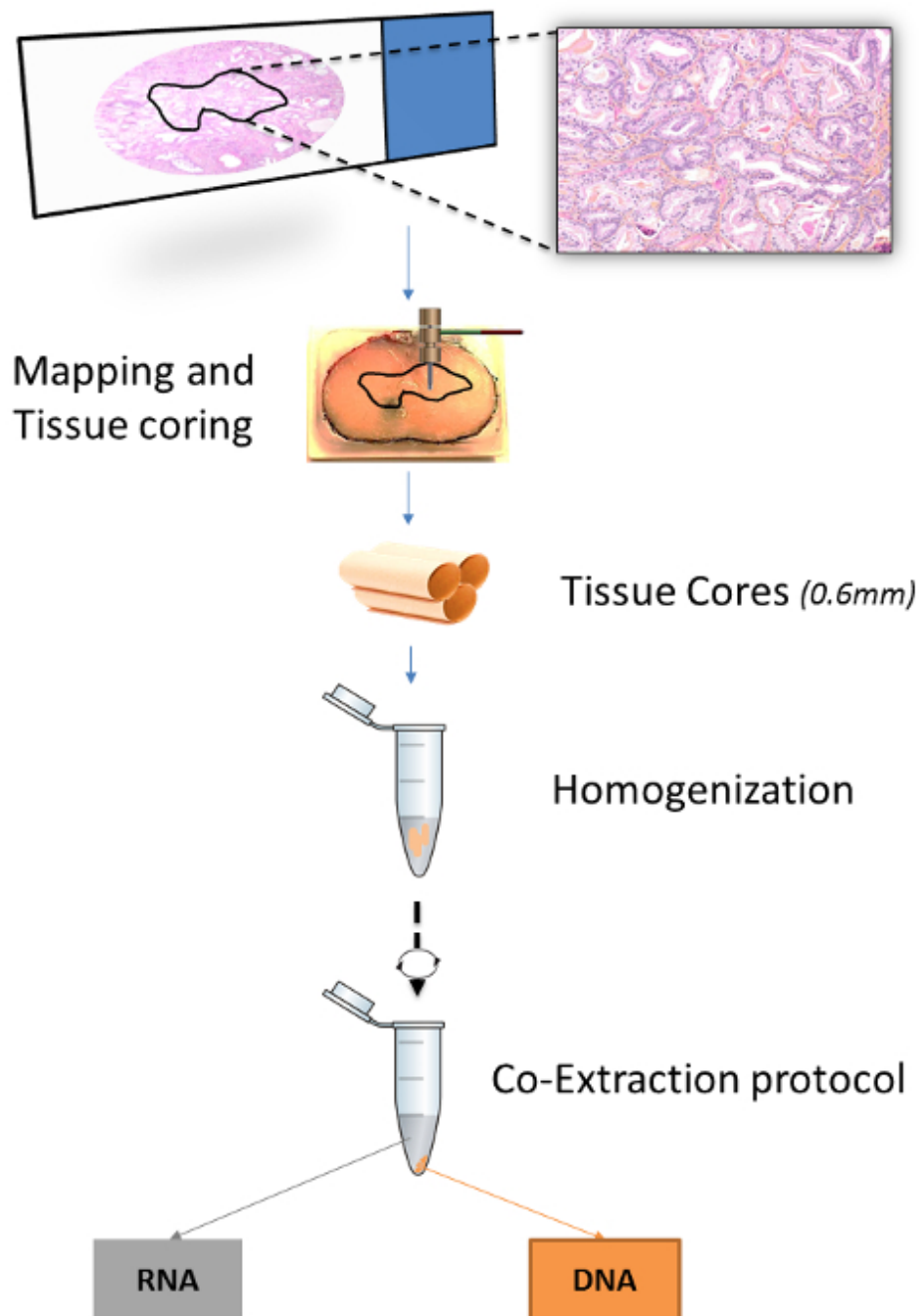


Figura 14. Marcaje de tejido, obtención de rollitos tisulares y extracción de RNA y DNA. Imagen de Patel P et al.⁹³. La figura muestra cómo un área de interés es marcada mediante un rotulador, de donde se obtienen unos cortes, los denominados rollitos. En la figura se muestran 3 rollitos de 0.6mm, en nuestro caso usamos 5 rollitos de 10 μ m (=0.01mm). Posteriormente la muestra se homogeneiza y se puede usar tanto para la extracción de RNA como DNA (en nuestro caso hemos eliminado el DNA).

4.6. DETERMINACIÓN DE INTEGRIDAD Y CALIDAD DE RNA

Una vez extraído el RNA, se evaluó su cantidad mediante espectrofotómetro Nanodrop y la integridad, pero en este caso utilizando el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology) ya que es necesaria una muy buena calidad del RNA para garantizar el éxito del ensayo.

La concentración y pureza de RNA se mide mediante espectrofotómetro Nanodrop. La concentración se calcula determinando su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260). La ratio de absorbancia A260/A280 es buen indicador de la pureza de RNA. Así, una ratio de 2.0-2.2 indica una pureza óptima de RNA, un cociente >1.7 se corresponde con una pureza aceptable y por debajo de este valor indica contaminación de RNA.

El Bionalizador 2100 permite la medición cualitativa y cuantitativa de muestras de RNA, combinando la microelectroforesis y la fluorescencia. La cantidad de fluorescencia se corresponde con la cantidad de RNA, mientras que la electroforesis proporciona un valor del número de integridad del RNA (RIN) que sirve para determinar su calidad. Este valor va desde el 1 al 10, así un valor de 10 corresponde a una muestra intacta y se aconseja tener un RIN de entre 4 y 6 para llevar a cabo experimentos con RT-PCR cuantitativa. En la tabla 5 se representa la utilidad de la muestra de RNA en función de RIN.

Valores de RIN	Utilidad de la muestra
≥ 7	Estudios de expresión génica
5-6	RT-PCR cuantitativa
< 4	RT-PCR de pequeñas regiones génicas

Tabla 6. Muestra la utilidad de las muestras de RNA en función del valor RIN (“Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca).Imagen adaptada de [Www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)”.

4.7. RTqPCR

La eliminación de DNA genómico y la retrotranscripción para la obtención del cDNA se llevaron a cabo utilizando el Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen) según el siguiente protocolo:

1. Descongelar y mantener la muestra de RNA sobre hielo. Descongelar gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Transcriptasa Reversa, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix y agua libre de RNAsas a temperatura ambiente (15–25°C). Mezclar bien el contenido de cada tubo agitándolos. Centrifugar brevemente para recoger los residuos de líquido de las paredes de los tubos, almacenar sobre hielo.
2. Preparar la reacción para eliminar el DNA genómico: 2µl de gDNA Wipeout Buffer, RNA (hasta 1 µl) y agua libre de RNAsas hasta completar 14 µl
3. Incubar durante 2 min a 42°C. Almacenar inmediatamente sobre hielo.
4. Preparar la mezcla de retrotranscripción sobre hielo: 1 µl de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4µl de Quantiscript RT Buffer, 1 µl de RT Primer Mix
5. Añadir la mezcla del paso 3 (14 µl) a la mezcla de retrotranscripción. Mezclar y almacenar sobre hielo.

6. Incubar 15 minutos a 42°C.
7. Incubar 3 minutos a 95°C para inactivar Quantiscript Transcriptasa Reversa.
8. Añadir la solución final a la mezcla de PCR en tiempo real

La expresión en los tejidos de los genes seleccionados Eng, sFlt-1 y PIGF se realizó mediante RT-PCR cuantitativa utilizando la tecnología de las sondas TaqMan® Universal PCR Master Mix comercializadas por Applied Biosystems™. Las sondas de qPCR utilizadas fueron: Endogлина (Hs00923996_m1), s-Flt-1(Hs01052961_m1), PIGF (Hs00182176_m1) y GAPDH (Hs99999905_m1) como control endógeno.

RTqPCR - siglas en inglés de “Real-time quantitative PCR” - es una técnica altamente sensible para cuantificar la cantidad absoluta o relativa de una secuencia específica de ácido nucleico. La cuantificación se realiza mediante el número de ciclos que se requieren para generar suficiente fluorescencia a partir de un punto de corte preestablecido. Este método, a parte de los dos primers utilizados para un proceso de amplificación, utiliza un fluorescente que hibrida con la secuencia a estudio. Contiene una sonda de oligonucleótidos con un colorante fluorescente en el extremo 5' y un colorante supresor en el extremo 3'. Si dicha sonda está íntegra, el supresor reduce la fluorescencia emitida y ésta no se detecta. Si, por el contrario, la secuencia objetivo está presente la sonda se separa del primer. Mientras dicho primer se amplía, la actividad de 5' nucleasa de la DNA polimerasa Taq disocia la sonda y se genera fluorescencia. Debido a la naturaleza exponencial de la PCR, la fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de productos generados por la PCR hasta alcanzar el punto de corte preestablecido. La determinación se realiza comparando el número de ciclo al cual la muestra del paciente llega a un nivel de fluorescencia determinado con una curva estandarizada de muestra de control. En la realización de PCR en tiempo real, una respuesta positiva es detectada por acumulación de señal fluorescente. Dicha señal se mide como número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral y dé como positiva la reacción. Dicho umbral de ciclos se llama Ct (de acrónimo en inglés cycle threshold). Los niveles Ct son inversamente proporcionales a la

cantidad de la proteína estudiada en la muestra (por ejemplo, cuanto menor es el Ct mayor cantidad de ADN o ARN hay en la muestra).

RTqPCR se realizó según el siguiente protocolo:

1. Pipetear en un tubo de Eppendorf de 1,5 ml los siguientes reactivos (se realiza para cada muestra y por cuadruplicado): 1 μ l de TaqMan® Gene Expression Assay, 10 μ l TaqMan® Gene Expression Master Mix, cDNA obtenido en el paso anterior (4 μ l) y 5 μ l de agua libre de RNasas.
2. Cerrar el tubo y agitar varias veces para mezclar los reactivos.
3. Centrifugar brevemente. Cargar la placa 1 transfiriendo 20 μ L de la mezcla reactiva de PCR preparada en el paso 1 y pipetearlos en cada pocillo de la placa reactiva
4. Cerrar la placa con su tapa correspondiente y centrifugar brevemente
5. Cargar la placa en el termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™), siguiendo el programa indicado por el fabricante.

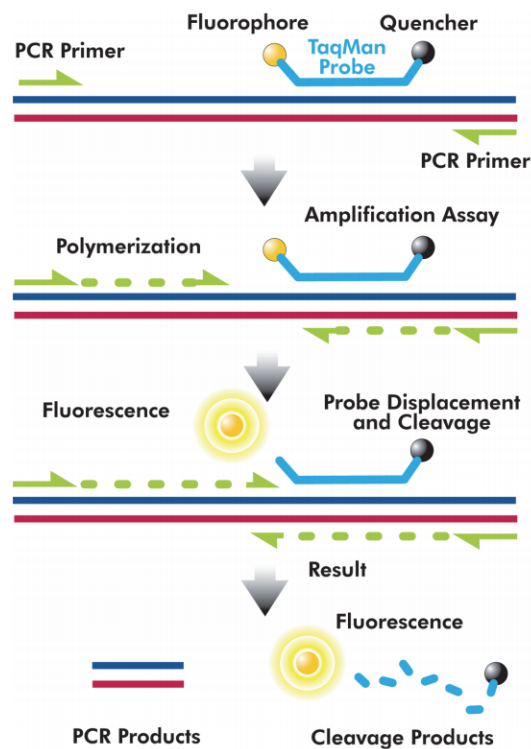


Figura 15. Funcionamiento de la sonda TaqMan. Imagen adaptada de <https://hmong.es/wiki/TaqMan>.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de las pacientes de cada bloque se ha realizado mediante el test Exacto de Fisher.

Los resultados de la determinación de factores angiogénicos se normalizaron usando un pool de muestras en cada panel. Dichos factores se expresan en medias y desviaciones estándares de la media o en medias con mínimos y máximos (cuando procede). Debido a que la distribución de nuestros resultados no cumple la distribución normal de las variables, se ha utilizado el test no paramétrico de U de Mann-Whitney y test de Kruskal-Wallis para comparar las diferencias entre los grupos. Se utilizaron las curvas Receiver Operating Characteristic (ROC) para calcular la capacidad diagnóstica de una determinada comparación, reflejándose en el área bajo la curva ROC (AUC) y en la relación entre la sensibilidad y la especificidad de cada factor angiogénico para la detección de endometriosis. Para estudiar la correlación entre dos variables emparejadas, cuantitativas y continuas se utilizó la correlación de Pearson. El punto de corte por debajo del cual se ha considerado la significación estadística fue $p=0.05$.

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism (v.8.0) (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. BLOQUE 1.

5.1.1. Características clínicas de las participantes

Para este bloque se han comparado 37 muestras de plasma de pacientes con endometriosis con 26 muestras de plasma de controles sanas. Las características clínicas y demográficas de las participantes de este bloque están reflejadas en la tabla 7. La edad media del grupo de endometriosis fue de 34 años mientras que del grupo control fue de 38 años. En cuanto a las intervenciones previas no hubo diferencias entre ambos grupos, siendo el porcentaje de intervenciones previas en el grupo de endometriosis de 37.8% y en el grupo control de 15.4%. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en relación a tratamiento hormonal previo a cirugía. Así, un 5.4% del grupo de endometriosis estuvieron en tratamiento hormonal en el momento de realizar la cirugía, mientras que ninguna paciente del grupo control ha realizado tratamiento hormonal. Hubo un 5.4% de enfermedad autoinmune en el grupo de estudio y este porcentaje fue comparable con el 3.8% del grupo control. Asimismo, en cuanto al hábito tabáquico, casi un tercio de todas las participantes eran fumadoras (29.7% en el grupo de endometriosis y 30.8% en el grupo control).

Del grupo de endometriosis (un total de 37 pacientes), 51.4% correspondían a endometriosis ováricas, mientras las restantes 48.6% fueron de endometriosis profundas. De éstas últimas, el 27.8% de pacientes tuvieron adenomiosis, mientras que no hubo ninguna adenomiosis en el grupo de endometriosis ovárica o en el grupo control. Un 38.9% de endometriosis profundas correspondían a endometriosis profundas aisladas, mientras que un 61.1% eran endometriosis ováricas-profundas. Además, el 61.1% de endometriosis profundas estaban asociadas a afectación orgánica. En cuanto a la recurrencia, hubo un 21.1% de endometriosis ováricas recurrentes en comparación con 38.9% de endometriosis profundas recurrentes.

	ENDOMETRIOSIS (N=37)		CONTROLS (N=26)	P-value
	Deep (N=18)	Ovarian (N=19)		
Age (years)	34 (18-47)		38 (29-45)	0.0024
	35 (18-47)	32 (20-45)		0.2601
Previous Gynecological Surgery	37.8% (14/37)		15.4% (4/26)	0.0879
	50.0% (9/18)	26.3% (5/19)		0.1837
Infertility	13.5% (5/37)		0% (0/26)	0.0714
	22.2% (4/18)	10.5% (2/19)		0.4048
Previous Hormonal Treatment	5.4 (2/37)		0% (2/26)	0.05074
	11.1% (2/18)	0% (0/19)		0.2297
Autoimmune disease	5.4% (2/37)		3.8% (1/26)	>0.9999
	0% (0/18)	10.5% (2/19)		0.4865
Tobacco	29.7% (11/36)		30.8% (8/26)	>0.9999
	33.3% (6/18)	26.3% (5/19)		0.7281
Dysmenorrhea	67.6% (25/37)		0% (0/26)	<0.0001
	77.8% (14/18)	57.9% (11/19)	-	0.2953
Adenomyosis	27.8% (5/18)	0% (0/19)	-	0.0197
Deep&Ovarian	61.1% (11/18)	0% (0/19)	-	<0.0001
Recurrence	38.89% (6/17)	21.1% (4/19)	-	0.2953
Organ involvement	61.1% (11/18)	0% (0/19)	-	<0.0001

Tabla 7. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 1.

5.1.2. Niveles de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes control y endometriosis como biomarcadores diagnósticos

Analizamos la concentración proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en muestras de plasma de 37 pacientes con endometriosis, incluyendo 18 endometriosis profundas y 19 endometriosis ováricas, y las comparamos con 26 muestras de pacientes control. La sEng fue detectada en todas las pacientes, mientras que para sFlt-1 y PIGF algunas pacientes fueron descartadas porque no se detectó expresión proteica. Así, para sFlt-1 hubo detección proteica en 10 pacientes control y 17 pacientes con endometriosis y, para PIGF, se detectó la expresión proteica en 18 controles y 12 pacientes con endometriosis. No hubo diferencias de sEng y PIGF entre los grupos de endometriosis y control, analizando todas las endometriosis juntas ni analizando por separado endometriosis ovárica y profunda (Figura 16A-B y Tabla 8). La expresión de sFlt-1 sí que presentó una

expresión diferencial significativa entre endometriosis y controles (p-value < 0.05). Específicamente, sFlt-1 se encontró 4 veces aumentado en endometriosis respecto control, siendo su expresión más elevada en endometriosis ovárica que en profundas. La expresión media en controles fue de 104.3pg/ml (0.9-386.2pg/ml), mientras que en endometriosis su expresión media fue de 417.1pg/ml (18.7-1482 pg/ml), siendo la expresión media en endometriosis profunda de 289.7 pg/ml y endometriosis ovárica de 530.3 pg/ml (Figura 16A-B y Tabla 8).

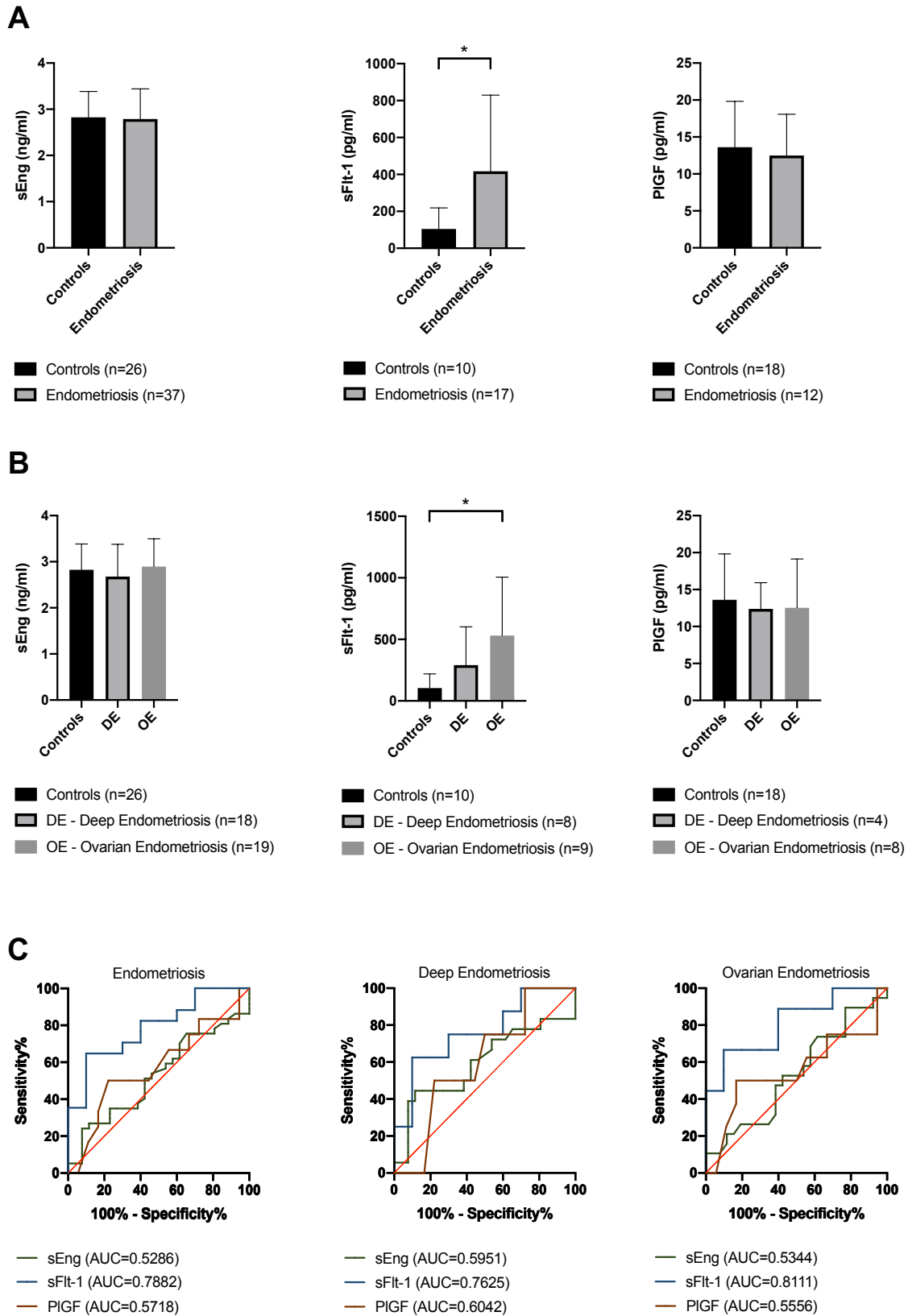


Figura 16. Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes control y endometriosis. **A.** Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en endometriosis y

controles. **B.** Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en endometriosis profunda, endometriosis ovárica y pacientes control. **C.** Curvas ROC de sEng, sFlt1 y PIGF para el diagnóstico de endometriosis, endometriosis profunda y endometriosis ovárica. Los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

	n	Controles	n	Endometriosis	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	37	2.7 (1.8-4)	0.7056
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	17	417.1 (18.7-1482)	0.0124
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	12	12.4 (5.5-22.4)	0.5237
	n	Controles	n	Endometriosis profunda	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	18	2.6 (1.8-4)	0.9463
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	8	289.7 (18.7-835.7)	0.2673
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	4	12.3 (10-17.5)	>0.9999
	n	Controles	n	Endometriosis ovárica	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	19	2.8 (1.9-3.8)	>0.9999
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	9	530.3 (18.9-1482)	0.0404
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	8	12.5 (5.5-22.4)	>0.9999

Tabla 8. Promedio de expresión en plasma de sEng, sFlt-1 y PIGF en grupo control y endometriosis, endometriosis profunda y endometriosis ovárica. En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

Para evaluar sEng, sFlt-1 y PIGF como potenciales biomarcadores diagnósticos de endometriosis en muestras de plasma, analizamos valores individuales de AUC (área bajo la curva ROC) (Figura 16C). El análisis ROC se realizó para todos los factores angiogénicos y para la detección de endometriosis, así como específicamente de endometriosis ovárica y profunda. Los valores AUC de sEng, y PIGF estuvieron en el rango de 0.52 a 0.60, confirmando así que no son potenciales marcadores diagnósticos. Por el contrario, se demuestra que sFlt-1 es un buen biomarcador para la detección de endometriosis con AUC de 0.78, y también para la detección de endometriosis profunda y ovárica con AUC de 0.76 y 0.81, respectivamente (Tabla 9).

Comparaciones ROC	AUC	Sensibilidad%	Especificidad%	p-value	
Endometriosis	<i>Eng</i>	0.5286	51.35	57.69	0.7010
	<i>sFlt-1</i>	0.7882	82.35	60.00	0.0139
	<i>PIGF</i>	0.5718	58.33	50.00	0.5117
Endometriosis profunda	<i>Eng</i>	0.5951	61.11	61.11	0.2881
	<i>sFlt-1</i>	0.7625	75.00	70.00	0.0621
	<i>PIGF</i>	0.6042	75.00	50.00	0.5232
Endometriosis ovárica	<i>Eng</i>	0.5344	57.89	46.15	0.6960
	<i>sFlt-1</i>	0.8111	77.78	60.00	0.0222
	<i>PIGF</i>	0.5556	62.50	44.44	0.6567

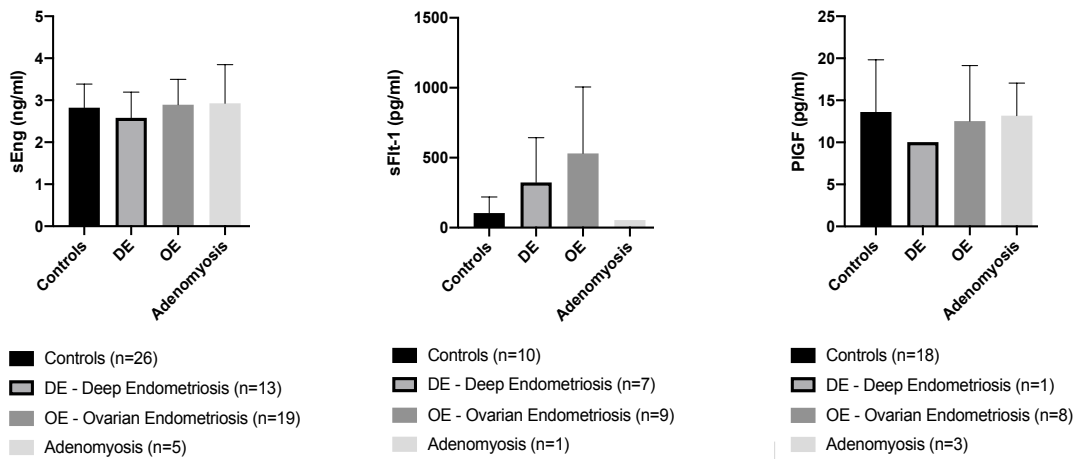
Tabla 9. Comparaciones ROC para reflejar la capacidad diagnóstica de Eng, sFlt-1 y PIGF en plasma. La tabla refleja todas las comparaciones realizadas y proporciona la información de áreas bajo la curva ROC, sensibilidad, especificidad y significancia estadística de cada comparación.

5.1.3. Niveles de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones

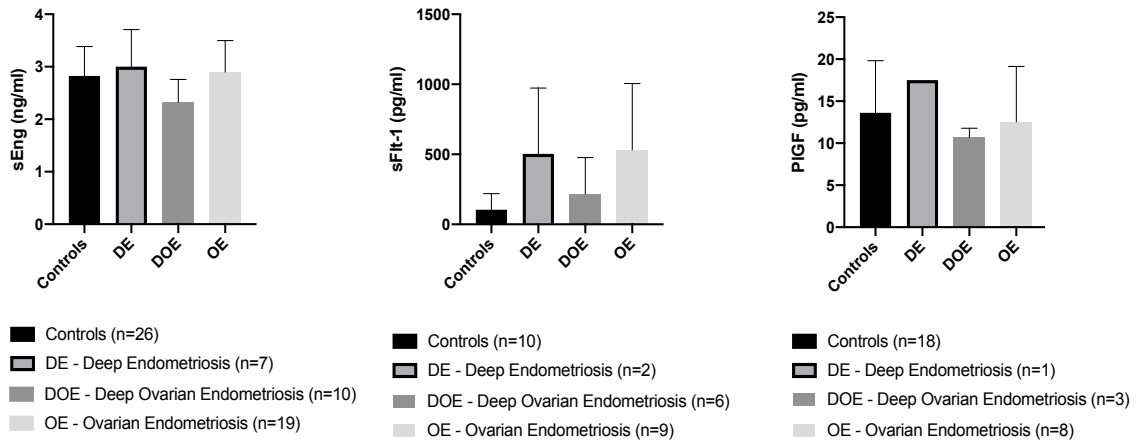
La endometriosis profunda y ovárica son los principales subtipos de endometriosis, aunque también frecuentemente se dan casos de asociación de endometriosis ovárica y profunda al mismo tiempo. Además, puede haber afectación de diferentes órganos, como afectación de miometrio (adenomiosis), afectación de recto, vejiga y otras localizaciones. Analizamos la concentración de proteínas de sEng, sFlt-1 y PIGF clasificando las endometriosis según diferentes localizaciones de la enfermedad (Figura 17 y Tabla 10). No encontramos diferencias para ningún factor en el grupo de adenomiosis ni en endometriosis ovárica-profunda. Sin embargo, sFlt-1 estaba incrementado de forma significativa ($p\text{-value} < 0.05$) en endometriosis profunda sin afectación orgánica en comparación al grupo control, mientras que no hubo diferencias para la expresión proteica de sEng y PIGF. Así, la expresión de sFlt-1 se encontró 4

veces mayor en endometriosis profunda sin afectación orgánica respecto al grupo control. La expresión media para la endometriosis sin afectación visceral fue de 414.7 pg/ml (146.5-835.7pg/ml), siendo la expresión media en el resto de los grupos similar a la del grupo control (Tabla 10).

A



B



C

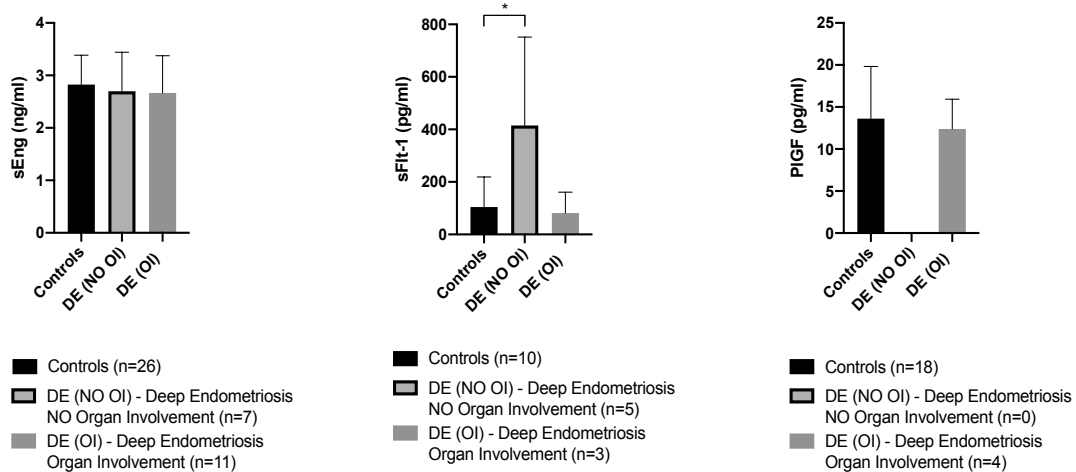


Figura 17. Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PlGF en plasma de pacientes control y endometriosis de diferentes localizaciones. **A.** Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PlGF en pacientes control y endometriosis de diferentes localizaciones, incluyendo endometriosis

ovárica, profunda y adenomiosis. **B.** Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en pacientes control y en diferentes tipos de endometriosis, incluyendo endometriosis ovárica, profunda y asociación de ovárica-profunda. **C.** Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en pacientes control y endometriosis profunda con o sin afectación orgánica. Los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

	n	Controles	n	Adenomiosis	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	5	2.9 (2.1-4)	>0.9999
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	1	54(54-54)	>0.9999
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	3	13.1 (10-17.5)	>0.9999
	n	Controles	n	Endometriosis ovárica-profunda	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	10	2.3 (1.8-3.4)	0.0801
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	5	218.5 (18.7-726.3)	>0.9999
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	3	10.6 (5.5-22.4)	>0.9999
	n	Controles	n	Endometriosis sin orgánica	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	7	2.6 (2-3.9)	>0.9999
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	9	414.7 (146.5-835.7)	0.0375
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	0	NA	NA
	n	Controles	n	Endometriosis con orgánica	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	11	2.6 (1.8-4)	>0.9999
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	3	81.3 (18.7-171.4)	>0.9999
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	4	12.3 (10-17.5)	0.5485

Tabla 10. Promedio de expresión en plasma de sEng, sFlt-1 y PIGF en grupo control y diferentes localizaciones de endometriosis, incluyendo adenomiosis, endometriosis ovárica-profunda, endometriosis profunda sin afectación orgánica y endometriosis profunda con afectación orgánica. En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor p<0.05.

5.1.4. Análisis de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma para evaluación de endometriosis recurrente

Evaluamos la concentración proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en muestras de plasma de 27 endometriosis primarias y 10 endometriosis recurrentes (Figura 18). Algunas pacientes fueron descartadas por no detectarse expresión proteica en sus muestras. No observamos diferencias estadísticamente significativas en sEng y PIGF, sin embargo, se puede observar una ligera tendencia a una mayor expresión de dichas proteínas en los casos recurrentes. Por el contrario, sFlt-1 estaba significativamente aumentado ($p < 0.05$) en endometriosis primaria en comparación con pacientes control y en la recurrencia sus niveles eran similares al grupo control. Específicamente, sFlt-1 se encontró 5 veces aumentado en endometriosis primaria respecto a control o 3 veces aumentado respecto a endometriosis recurrente. La expresión media en controles fue de 104.3pg/ml (0.9-386.2pg/ml), mientras que en endometriosis primaria su expresión media fue de 520.7pg/ml (18.7-1482 pg/ml) y la expresión media en endometriosis recurrente de 168.3 pg/ml (54-334.6 pg/ml). El promedio de expresión de cada grupo se refleja en la tabla 11.

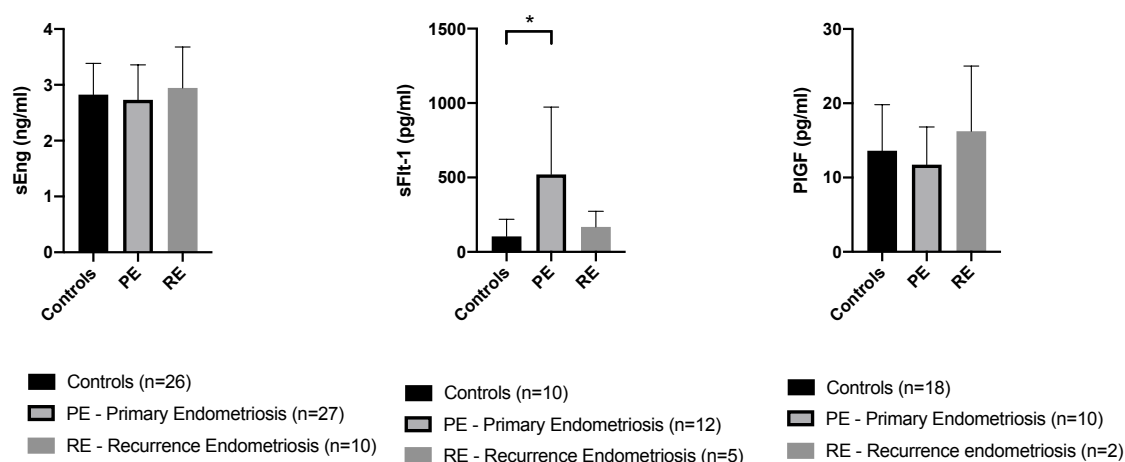


Figura 18. Nivel de expresión proteica de sEng, sFlt-1 y PIGF en plasma de pacientes con endometriosis primaria y endometriosis recurrente. Los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

	n	Controles	n	Endometriosis primaria	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	27	2.7 (1.9-4)	>0.9999
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	12	520.7 (18.7-1482)	0.0246
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	10	11.7 (5.5-21.4)	>0.9999
	n	Controles	n	Endometriosis recurrente	p-value
sEng (ng/ml)	26	2.8 (2-3.6)	10	2.9 (1.8-3.9)	>0.9999
sFlt-1 (pg/ml)	10	104.3 (0.9-386.2)	5	168.3 (54-334.6)	0.7789
PIGF (pg/ml)	18	13.6 (2-29.8)	2	16.2 (10-22.4)	>0.9999

Tabla 11. Promedio de expresión en plasma de sEng, sFlt-1 y PIGF en grupo control y endometriosis primaria y recurrente. En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

5.2. BLOQUE 2.

5.2.1. Características clínicas de las participantes

Para este bloque se han comparado 33 aspirados endometriales de pacientes con endometriosis con 33 aspirados de controles sanas. Las características clínicas y demográficas de las participantes de este bloque están reflejadas en la tabla 12. La edad media del grupo de endometriosis fue de 33 años mientras que del grupo control fue de 37 años. En el grupo de endometriosis, la tasa de cirugía ginecológica previa y de dismenorrea fueron significativamente más altas que en el grupo control. Así, un tercio de las pacientes con endometriosis tuvieron antecedente de cirugía previa, mientras que solo un 3% de los controles habían referido antecedentes quirúrgicos y dos tercios de las pacientes con endometriosis tuvieron dismenorrea en comparación al 9% en el grupo control. No hubo diferencias entre los grupos en cuanto a la infertilidad, antecedente de enfermedad autoinmune o hipermenorrea. Así, un 12.1% de las pacientes con endometriosis y un 3% de las pacientes del grupo control refirieron infertilidad. Hubo un 4% de pacientes con enfermedad autoinmune en el grupo de endometriosis, mientras que no hubo ninguna participante del grupo control que haya referido antecedente de dicha enfermedad. En cuanto al hábito tabáquico, un tercio de las pacientes con endometriosis eran fumadoras, sin embargo, no

se pudieron comparar estos datos con el grupo control, debido a que esta variable no se recogió en este grupo. Dentro del grupo de endometriosis, no hubo diferencias de hábito tabáquico entre las pacientes con endometriosis profunda y ovárica. Por último, un 26.7% de pacientes con endometriosis profunda tuvieron además adenomiosis, mientras que no hubo ninguna adenomiosis en el grupo de endometriosis ovárica ni en el grupo control.

De 33 pacientes del grupo de endometriosis, 18 pacientes pertenecen al grupo de endometriosis ovárica, mientras las 15 restantes constituyen el grupo de endometriosis profunda. Un 40% de las endometriosis profundas correspondían a endometriosis profundas aisladas, mientras que los restantes 60% eran endometriosis ováricas-profundas. Además, el 66.7% de endometriosis profundas tenía afectación de algún órgano. En cuanto a la recurrencia, hubo un 16.7% de endometriosis ováricas recurrentes en comparación con 33.3% de endometriosis profundas recurrentes.

	ENDOMETRIOSIS (N=33)		CONTROLS (N=33)	
	Deep (N=15)	Ovarian (N=18)		P-value
Age (years)*	33 (18-47)		37 (27-40)	0.0232
	35 (18-47)	33 (20-45)		0.3108
Previous Gynecological Surgery	33.3% (11/33)		3% (1/33)	0.0027
	46.7% (7/15)	22.2% (4/18)		0.1631
Infertility	12.1% (4/33)		3% (1/33)	0.3553
	13.3% (2/15)	11.1% (2/18)		>0.9999
Autoimmune disease	3% (1/33)		0% (0/33)	>0.9999
	0% (0/15)	12.5% (1/18)		>0.9999
Tobacco	24.2% (8/33)		NA	NA
	26.7% (4/15)	22.2% (4/18)		>0.9999
Dysmenorrhea	66.6% (22/33)		9.1% (3/33)	<0.0001
	73.3% (11/15)	61.1% (11/18)		0.7120
Hypermenorrhea	6.1% (2/33)		0% (0/33)	0.4923
	6.7% (1/15)	12.5% (1/18)		>0.9999
Adenomyosis	26.7% (4/15)	0% (0/18)	-	0.0334
Deep&Ovarian	60% (9/15)	0% (0/18)	-	0.0001
Recurrence	33.3% (5/15)	16.7% (3/18)	-	0.4184
Organ Involvement	66.7% (10/15)	0% (0/18)	-	<0.0001

Tabla 12. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 2.

5.2.2. Niveles de expresión proteica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis como biomarcadores diagnósticos

La expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF se detectó en todas los pacientes y estaba significativamente más baja en aspirado endometrial de pacientes con endometriosis en comparación a controles ($p < 0.0001$, Fold-change 0.45; $p < 0.0001$, Fold-change 0.31 and $p < 0.0001$, Fold-change 0.13, respectivamente). (Figura 19A y Tabla 13). La expresión de dichos factores también fue analizada en endometriosis ovárica y endometriosis profunda por separado. Se detectó una expresión significativamente más baja en endometriosis ovárica y endometriosis profunda en comparación con controles, sin embargo, no hubo diferencias de expresión entre dichos subtipos de endometriosis (Figura 19B y Tabla 13). Así, en endometriosis profunda la expresión de Eng, sFlt-1 y PLGF estaba significativamente disminuida respecto a controles ($p = 0.0003$, Fold-change 0.58; $p < 0.0001$, Fold-change 0.33 y $p < 0.0001$, Fold-change 0.06, respectivamente) y en endometriosis ovárica respecto al grupo control ($p = 0.0035$, Fold-change 0.40, $p < 0.0001$, Fold-change 0.30, $p < 0.0001$, Fold-change 0.13, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto una disminución generalizada de los 3 factores angiogénicos estudiados en aspirado endometrial de pacientes con endometriosis, independientemente del subtipo de la enfermedad.

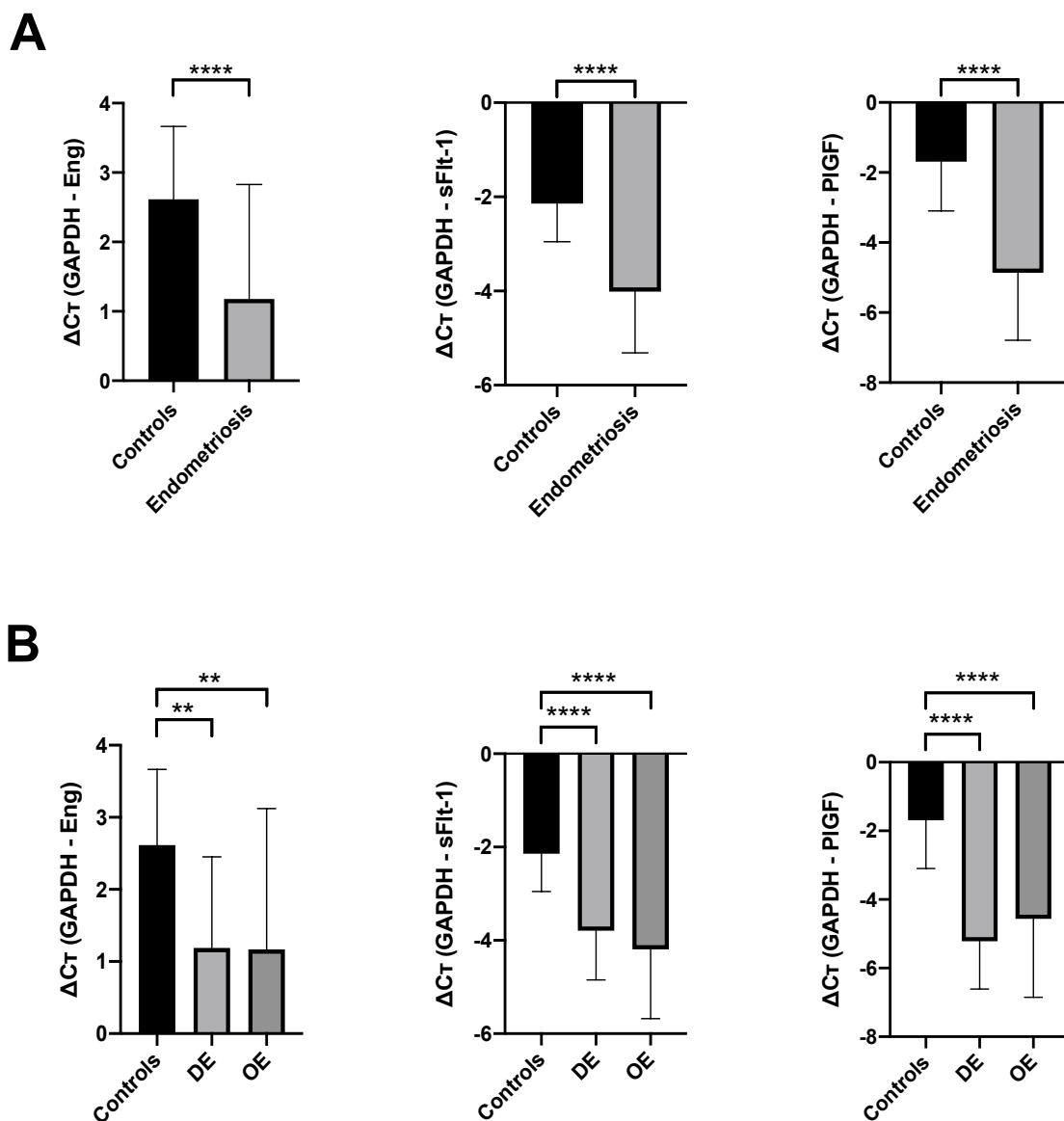


Figura 19. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes con endometriosis y controles. **(A)** Niveles de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de controles (n=33) y pacientes con endometriosis (n=33). **(B)** Niveles de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de controles (n=33), endometriosis profunda (DE) (n=15) y endometriosis ovárica (OE) (n=18). Se utilizó GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

	n	Controles	n	Endometriosis	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	33	2.6 (0.2 – 4.2)	33	1.1 (-2.5 – 4.9)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	33	-4 (-7.8 – -1.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	33	-4.8 (-8.3 – 0.1)	<0.0001
	n	Controles	n	Endometriosis profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	33	2.6 (0.2 – 4.2)	15	1.1 (-1.1 – 3.2)	0.0041
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	15	-3.7 (-5.8 – -1.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	15	-4.1 (-7.8 – -1.5)	<0.0001
	n	Controles	n	Endometriosis ovárica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	33	2.6 (0.2 – 4.2)	18	1.1 (-2.5 – 4.9)	0.0051
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	18	-5.2 (-6.5 – -2.5)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	18	-4.5 (-8.3 – 0.1)	<0.0001

Tabla 13. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis, así como sus subtipos (endometriosis profunda y endometriosis ovárica). En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

Para evaluar el potencial de Eng, sFlt-1 y PIGF como biomarcadores diagnósticos de endometriosis en aspirado uterino, generamos curvas ROC para cada factor comparando endometriosis (ovárica, profunda o ambas) respecto a controles. Observamos que Eng, sFlt-1 y PIGF mostraron unos valores AUC de 0.78, 0.90 y 0.89 respectivamente, comparando todas las endometriosis con controles (Figura 20A y Tabla 14). Destacablemente, podemos aumentar el poder diagnóstico si analizamos la endometriosis profunda por separado con AUC de 0.82, 0.89 y 0.94 (Figura 20B y Tabla 14), mientras que en endometriosis ovárica detectamos un potencial diagnóstico inferior con valores AUC de 0.75, 0.90 y 0.86 (Figura 20C y Tabla 14).

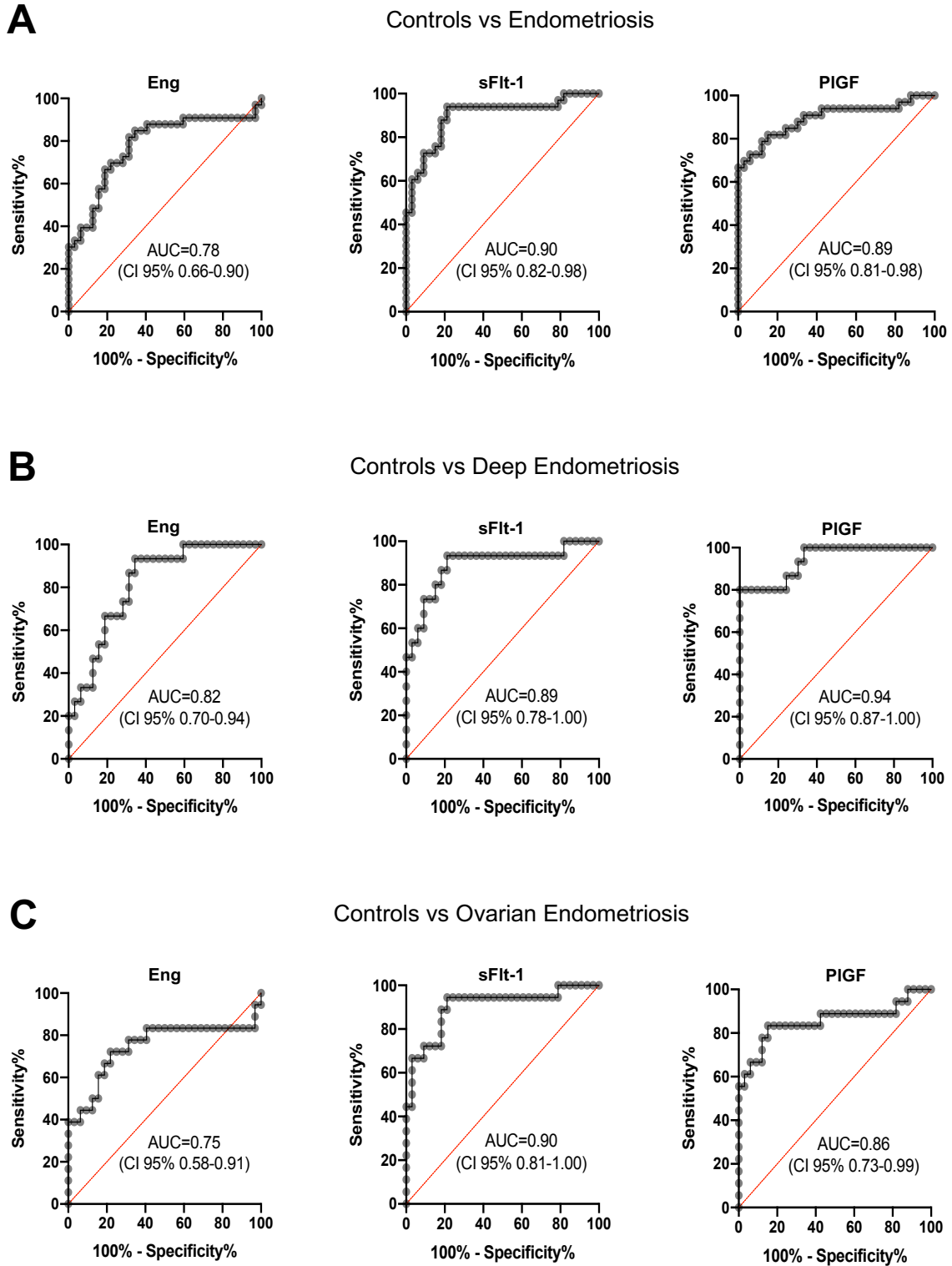


Figura 20. Curvas ROC para Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales comparando pacientes con endometriosis y controles. **(A)** Curvas ROC para Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado endometrial comparando endometriosis y controles. **(B)** Curvas ROC para Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado endometrial comparando endometriosis profunda y pacientes control. **(C)** Curvas ROC para Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado endometrial comparando endometriosis ovárica y controles.

Comparaciones ROC	AUC	Sensibilidad%	Especificidad%	p-value	
Endometriosis	<i>Eng</i>	0.7794	81.82	65.63	0.0001
	<i>sFlt-1</i>	0.8972	93.94	78.79	<0.0001
	<i>PIGF</i>	0.8944	90.91	66.67	<0.0001
Endometriosis profunda	<i>Eng</i>	0.8188	93.33	65.63	0.0005
	<i>sFlt-1</i>	0.8909	93.33	78.79	<0.0001
	<i>PIGF</i>	0.9414	86.67	75.76	<0.0001
Endometriosis ovárica	<i>Eng</i>	0.7465	77.78	65.63	0.0041
	<i>sFlt-1</i>	0.9024	94.44	78.79	<0.0001
	<i>PIGF</i>	0.8552	83.33	84.85	<0.0001

Tabla 14. Comparaciones ROC para reflejar la capacidad diagnóstica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales. La tabla refleja todas las comparaciones realizadas y proporciona la información de áreas bajo la curva ROC, sensibilidad, especificidad y significancia estadística de cada comparación.

5.2.3. Niveles de expresión proteica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, los subtipos más frecuentes de endometriosis son la ovárica y la profunda. La asociación entre ambas también es frecuente, además, la endometriosis puede afectar a diferentes estructuras y órganos como el miometrio, recto, vejiga, uréter y otros. En primer lugar, clasificamos a todas las pacientes como endometriosis ovárica, endometriosis profunda y adenomiosis y las comparamos con pacientes control (Figura 21A y Tabla 15). Observamos una expresión significativamente menor de Eng, sFlt-1 y PIGF en endometriosis ovárica y profunda respecto a controles. Sin embargo, no hubo diferencias entre el grupo de adenomiosis y grupo control, grupo de endometriosis profunda o grupo de endometriosis ovárica. En segundo lugar, separamos las endometriosis profundas aisladas de las endometriosis ováricas-profundas (Figura 21B y Tabla 15). Se detectó una menor expresión de

Eng, sFlt-1 y PIGF en todos los tipos de endometriosis en comparación con el grupo control, sin embargo, no hubo diferencias entre los grupos de endometriosis mencionados. En tercer lugar, analizamos endometriosis profunda asociada o no a afectación orgánica (Figura 21C y Tabla 15). Hubo una expresión significativamente menor de Eng y PIGF en endometriosis profunda independientemente de presencia o ausencia de afectación orgánica. En el caso de sFlt-1, estas diferencias solo se detectaron en endometriosis profunda con afectación orgánica. En definitiva, no encontramos diferencias significativas entre presencia o ausencia de afectación orgánica.

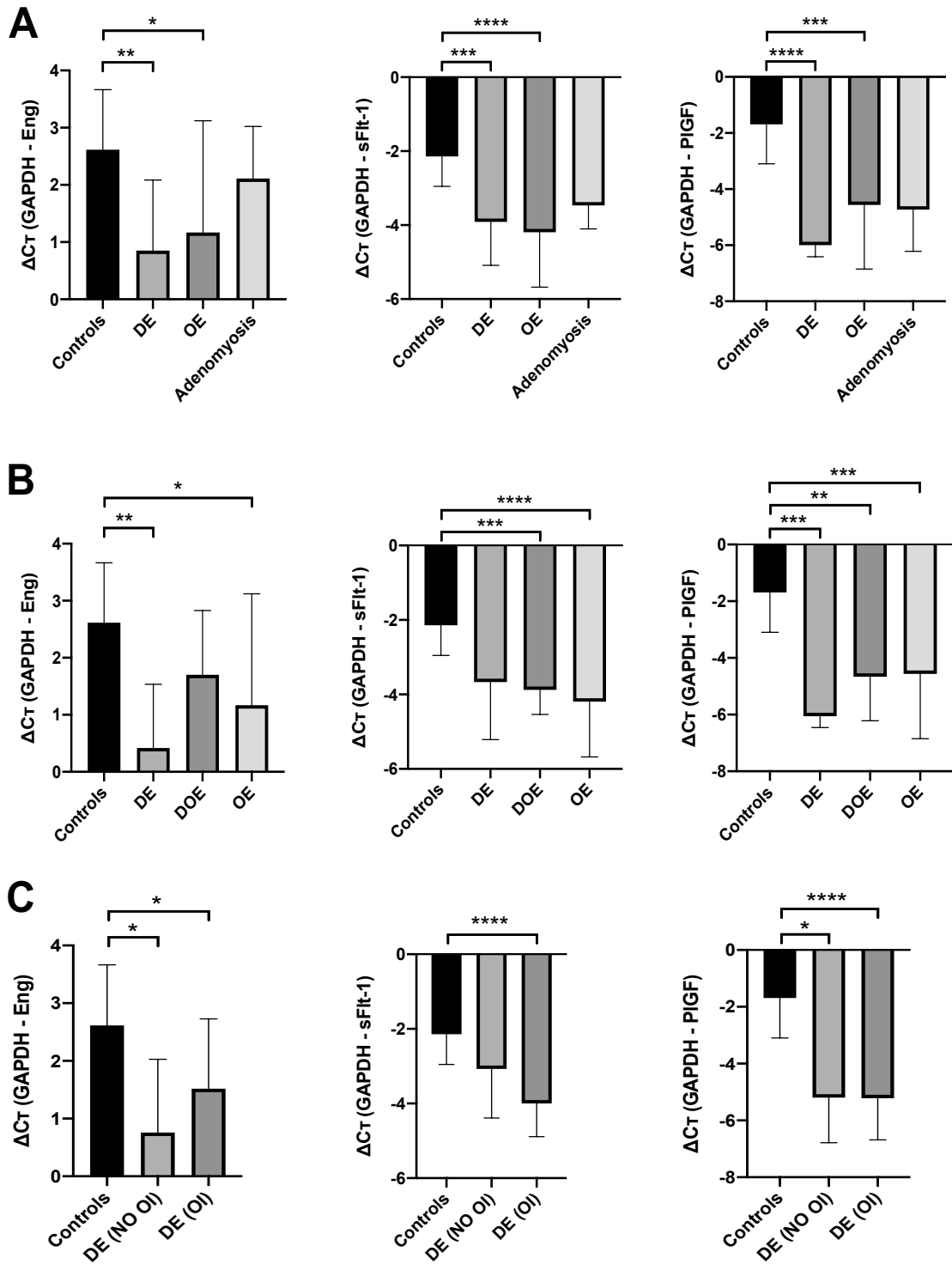


Figura 21. Expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes con diferentes localizaciones de endometriosis. **(A)** Niveles de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control (n=33), endometriosis profunda (DE) (n=11), endometriosis ovárica (OE) (n=18) y adenomiosis (n=4). **(B)** Niveles de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de paciente control (n=33), DE (n=6), endometriosis ovárica-profunda (DOE) (n=9) y OE (n=18). **(C)** Niveles de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control

(n=33), endometriosis profunda sin afectación orgánica (DE NO OI) (n=4) y endometriosis profunda con afectación orgánica (DE OI) (n=10). Se utilizó GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

	n	Controles	n	Adenomiosis	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	33	2.6 (0.2 – 4.2)	4	2.1 (1.1 – 3.2)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	4	-3.4 (-4.2 – -2.7)	0.1471
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	4	-4.7 (-6.5 – -2.9)	0.0744
	n	Controles	n	Endometriosis ovárica-profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	33	2.6 (0.2 – 4.2)	9	1.1 (-2.5 – 4.9)	0.3969
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	9	-3.8 (-4.9 – -3)	0.0009
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	9	-4.6 (-6.5 – -2.5)	0.0043
	n	Controles	n	Endometriosis sin orgánica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	33	2.6 (0.2 – 4.2)	4	0.7 (-0.8 – 1.9)	0.0277
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	4	-3 (-4.6 – -1.4)	0.5227
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	4	-5.1 (-6.2 – -2.8)	0.0206
	n	Controles	n	Endometriosis con orgánica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	33	2.6 (0.2 – 4.2)	10	1.5 (-1.1 – 3.2)	0.0347
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	10	-3.9 (-5.8 – -2.7)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	10	-5.2 (-6.5 – -2.5)	<0.0001
	n	Adenomiosis	n	Endometriosis profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	4	2.1 (1.1 – 3.2)	11	0.8 (-1.1 – 2.3)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	4	-3.4 (-4.2 – -2.7)	11	-3.9 (-5.8 – -1.4)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	4	-4.7 (-6.5 – -2.9)	9	-5.9 (-6.5 – -5.3)	>0.9999
	n	Adenomiosis	n	Endometriosis ovárica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	4	2.1 (1.1 – 3.2)	18	1.1 (-2.5 – 4.9)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	4	-3.4 (-4.2 – -2.7)	18	-4.1 (-7.8 – -1.5)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	4	-4.7 (-6.5 – -2.9)	18	-4.5 (-8.3 – 0.1)	>0.9999
	n	Endometriosis ovárica-profunda	n	Endometriosis profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	9	1.1 (-2.5 – 4.9)	11	0.8 (-1.1 – 2.3)	0.8555
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	9	-3.8 (-4.9 – -3)	11	-3.9 (-5.8 – -1.4)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	9	-4.6 (-6.5 – -2.5)	9	-5.9 (-6.5 – -5.3)	>0.9999

	n	Endometriosis sin orgánica	n	Endometriosis con orgánica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	4	0.7 (-0.8 – 1.9)	10	1.5 (-1.1 – 3.2)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	4	-3 (-4.6 – -1.4)	10	-3.9 (-5.8 – -2.7)	0.4797
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	4	-5.1 (-6.2 – -2.8)	10	-5.2 (-6.5 – -2.5)	>0.9999

Tabla 15. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y diferentes localizaciones de endometriosis, incluyendo adenomiosis, endometriosis ovárica-profunda, endometriosis profunda sin afectación orgánica y endometriosis profunda con afectación orgánica. En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

5.2.4. Análisis de expresión proteica de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado endometrial para evaluación de endometriosis recurrente

Para predecir los casos de endometriosis recurrente comparamos la actividad angiogénica a nivel de aspirado uterino entre los casos de endometriosis recurrente y no recurrente. Hubo una expresión significativamente menor de Eng, s-Flt1 and PIGF en casos de endometriosis recurrente y no recurrente en comparación con los controles. La expresión de los 3 factores analizados estaba significativamente más baja en el grupo de endometriosis no recurrente en comparación con grupo control ($p=0.0027$, Fold-change 0.48; $p<0.0001$, Fold-change 0.34; $p<0.0001$, Fold-change 0.16, respectivamente) y en el grupo de endometriosis recurrente vs grupo control ($p=0.0075$, Fold-change 0.52; $p<0.0001$, Fold-change 0.24; $p<0.0001$, Fold-change 0.05, respectivamente). Aunque no hubo diferencias entre las endometriosis recurrente y no recurrente, observamos una ligera tendencia hacia una menor expresión en los casos recurrentes (Figura 22A y Tabla 16). También analizamos la recurrencia en las diferentes localizaciones de endometriosis. Por un lado, sFlt-1 y PIGF se expresaron en menor cantidad en endometriosis profunda recurrente y no recurrente en comparación con el grupo control, mientras que, la Eng únicamente mostró una menor expresión en endometriosis profunda no recurrente en comparación con los controles. Tampoco hubo diferencias entre los grupos de endometriosis profunda recurrente y no recurrente (Figure 22B y Tabla 16).

Obtuvimos resultados similares en endometriosis ovárica, donde sFlt-1 y PIGF presentaron una expresión significativamente menor en endometriosis recurrente y no recurrente respecto al grupo control, mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la Eng entre los grupos. Destaca una tendencia hacia una menor expresión de los factores angiogénicos en endometriosis ovárica recurrente respecto a la no recurrente (Figure 22C y Tabla 16).

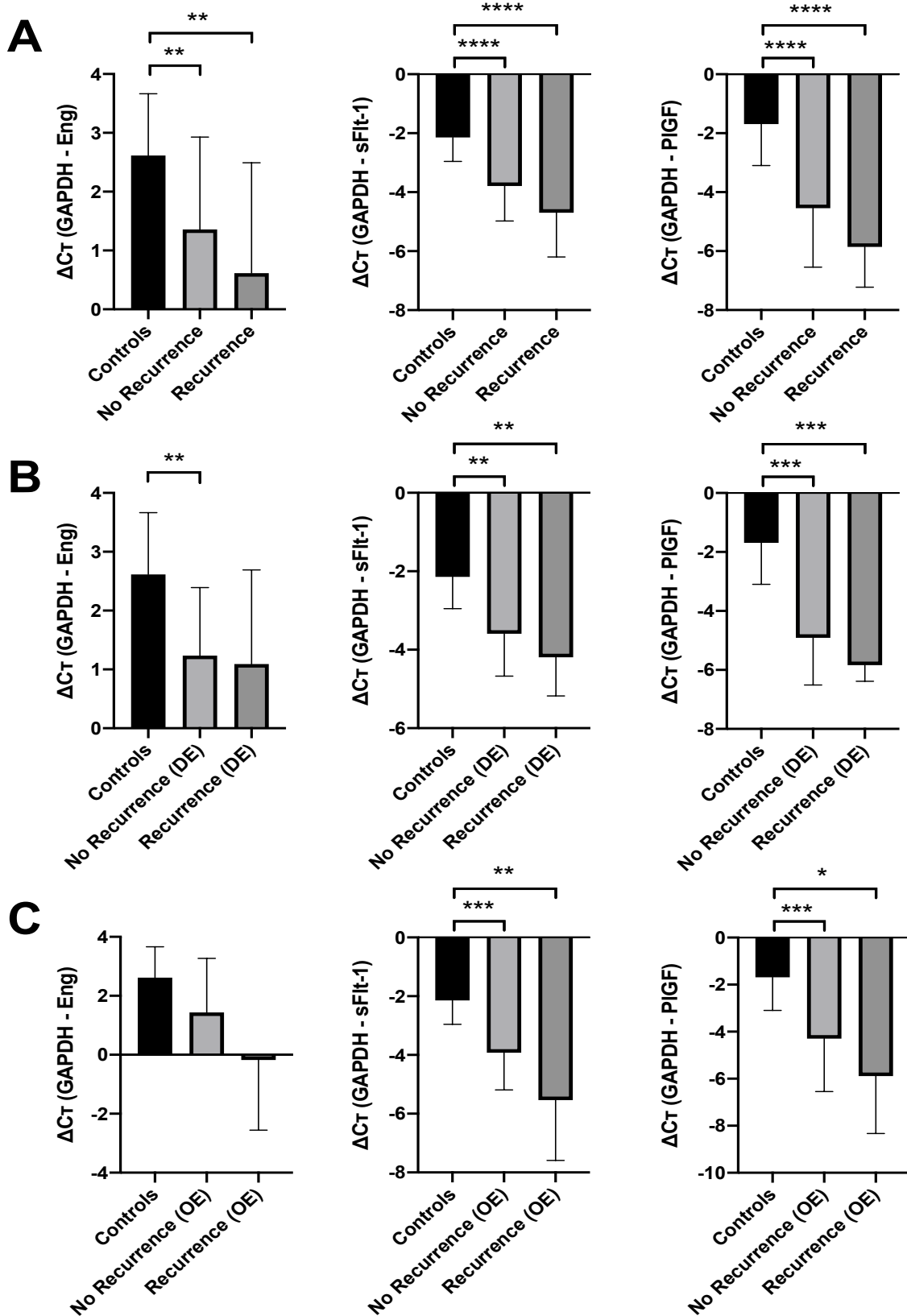


Figura 22. Expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirado endometrial de pacientes control y endometriosis recurrente, no recurrente, endometriosis profunda recurrente y no recurrente, endometriosis ovárica recurrente y no recurrente. Se utilizó GAPDH como control endógeno y

los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

	n	Controles	n	Endometriosis no recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	32	2.6 (0.2 – 4.2)	25	1.3 (-1.3 – 4.9)	0.0027
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	25	-3.7 (-6 – -1.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	25	-4.5 (-7.5 – 0.1)	<0.0001
	n	Controles	n	Endometriosis recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	32	2.6 (0.2 – 4.2)	8	0.6 (-2.5 – 3.2)	0.0075
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	8	-4.6 (-7.8 – -3.2)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	8	-5.8 (-8.3 – -3.4)	<0.0001
	n	Controles	n	EP no recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	32	2.6 (0.2 – 4.2)	10	1.2 (-0.8 – 2.4)	0.0077
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	10	-3.5 (-4.9 – -1.4)	0.0025
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	10	-4.9 (-6.5 – -2.5)	0.0003
	n	Controles	n	EP recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	32	2.6 (0.2 – 4.2)	5	1 (-1.1 – 3.2)	0.0692
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	5	-4.1 (-5.8 – -3.2)	0.0024
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	5	-5.8 (-6.3 – -5.1)	0.0009
	n	Controles	n	EO no recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	32	2.6 (0.2 – 4.2)	15	1.4 (-1.3 – 4.9)	0.0557
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	15	-3.9 (-6 – -1.5)	0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	15	-4.2 (-7.5 – 0.1)	0.0008
	n	Controles	n	EO recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	32	2.6 (0.2 – 4.2)	3	-0.1 (-2.5 – 2.2)	0.0638
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	33	-2.1 (-4 – -0.75)	3	-5.5 (-7.8 – -3.8)	0.0071
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	33	-1.6 (-3.9 – 1.0)	3	-5.8 (-8.3 – -3.4)	0.0195
	n	Endometriosis no recurrencia	n	Endometriosis recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	25	1.3 (-1.3 – 4.9)	8	0.6 (-2.5 – 3.2)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	25	-3.7 (-6 – -1.4)	8	-4.6 (-7.8 – -3.2)	0.7043
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	25	-4.5 (-7.5 – 0.1)	8	-5.8 (-8.3 – -3.4)	0.6384

Tabla 16. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en aspirados endometriales de pacientes control y endometriosis con y sin recurrencia, así como endometriosis profunda con y sin

recurrencia y endometriosis ovárica con y sin recurrencia. En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

5.3. BLOQUE 3.

5.3.1. Características clínicas de las participantes

En este bloque se ha comparado tejido endometriósico de 75 pacientes con endometriosis con 44 controles sin endometriosis (22 muestras de tejido retrocervical como control de endometriosis profunda y 22 quistes simples de ovario como controles de endometriosis ovárica). Las características clínicas y demográficas de las participantes de este bloque están reflejadas en las tablas 17 y 18. La edad media del grupo de endometriosis fue 34 años mientras que la del grupo control fue 44 años. No hubo diferencias entre los 2 grupos en cuanto a intervenciones previas, tratamiento hormonal previo, enfermedad autoinmune o tabaquismo. Así, un 38% de las pacientes con endometriosis tuvieron cirugía previa en comparación con un 34% del grupo control. Había casi un tercio de fumadoras en ambos grupos, cerca del 15% de pacientes con endometriosis y controles habían estado con tratamiento hormonal previo, el 8% de pacientes del grupo de endometriosis tuvieron asociada una enfermedad autoinmune en comparación con el 4.6% del grupo control. Sin embargo, hubo diferencias entre los grupos en cuanto al índice de infertilidad y de dismenorrea. Así, el 21% de pacientes con endometriosis refirieron infertilidad mientras que ninguna paciente del grupo control había referido dicho problema, además, el índice de dismenorrea fue del 70% en el grupo de endometriosis respecto al 11% en el grupo control.

De 75 pacientes del grupo de endometriosis, 31 pertenecen al grupo de endometriosis ováricas, mientras que las 44 restantes constituyen el grupo de endometriosis profunda. Casi un tercio de las endometriosis profundas correspondían a endometriosis profundas aisladas, mientras que el 70% eran endometriosis ováricas-profundas. Además, el 20.5% de endometriosis profundas estaban asociadas a adenomiosis y un 60% tenían asociada la

afectación del algún órgano como recto, vejiga o uréter, entre otros. En cuanto a la recurrencia, hubo un 35.5% de endometriosis ováricas recurrentes en comparación con 52.3% de endometriosis profundas recurrentes.

	Endometriosis (N=74)	Controls (N=44)	P-value
Age (years)*	34 (18-47)	44 (17-57)	<0.0001
Previous Gynecological Surgery	38.7% (29/75)	34.1% (15/44)	0.6959
Infertility	21.33% (16/75)	0% (0/44)	0.0005
Previous Hormonal Treatment	14.7% (11/75)	15.9% (7/44)	>0.9999
Autoimmune disease	8% (6/75)	4.6% (2/44)	0.7085
Tobacco	32% (24/75)	29.6% (13/44)	0.8395
Dysmenorrhea	70.7% (53/75)	11.4% (5/44)	<0.0001

Tabla 17. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 3. Endometriosis vs controles.

	Deep (N=44)	Controls (N=22)	P-value	Ovarian (N=31)	Controls (N=22)	P-value	P-value*
Age (years)	34 (18-47)	47 (34-57)	<0.0001	33 (20-45)	42 (17-51)	<0.0001	0.5011
Previous Gynecological Surgery	54.6% (24/44)	36.4% (8/22)	0.1978	16.1% (5/31)	31.8% (7/22)	0.2018	0.0008
Infertility	29.6% (13/44)	0% (0/22)	0.0030	9.7% (3/31)	0% (0/22)	0.2576	0.0478
Previous Hormonal Treatment	18.2% (8/44)	22.73% (5/22)	0.7464	9.7% (3/31)	9.1% (2/22)	>0.9999	0.3457
Autoimmune disease	6.8% (3/44)	0% (0/22)	0.5452	9.7% (3/31)	9.1% (2/22)	>0.9999	0.6865
Tobacco	40.9% (18/44)	18.2% (4/22)	0.0965	19.4% (6/31)	40.9% (9/22)	0.1236	0.0775
Dysmenorrhea	84.1% (37/44)	18.2% (4/22)	<0.0001	51.6% (16/31)	4.6% (1/22)	0.0003	0.0041
Adenomyosis	20.5% (9/44)	-	-	0% (0/31)	-	-	0.0086
Deep&Ovarian	70.5% (31/44)	-	-	0% (0/31)	-	-	<0.0001
Recurrence	52.3% (23/44)	-	-	35.5% (11/31)	-	-	0.1664
Ovarian involvement	59.1% (26/44)	-	-	0% (0/31)	-	-	<0.0001

Tabla 18. Distribución de las características clínicas de participantes del bloque 3. Endometriosis profunda vs controles, endometriosis ovárica vs controles. Endometriosis profunda vs endometriosis ovárica.

5.3.2. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis

Para entender mejor el papel de la angiogénesis en endometriosis, comparamos la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometrial ectópico de muestras parafinadas de pacientes con endometriosis y pacientes control. En concreto, comparamos 22 muestras de tejido retrocervical de pacientes sin endometriosis con 54 muestras de endometriosis profunda y 22 muestras de cistoadenomas ováricos con 38 muestras de endometriosis ovárica. La expresión RNA de los tres factores se detectó en todas las muestras analizadas y estaba significativamente más alta en tejido endometriósico en comparación con el grupo control. Concretamente, el análisis RTqPCR mostró niveles significativamente aumentados de Eng, sFlt-1 and PIGF en endometriosis profunda respecto a tejido retrocervical ($p < 0.0001$, Fold-change 9.15; $p < 0.0001$, Fold-change 3.64 y $p < 0.0001$, Fold-change 7.26, respectivamente) y también en endometriosis ovárica respecto a quiste simple de ovárico (Eng $p = 0.0142$, Fold-change 4.47; sFlt-1 $p = 0.0004$, Fold-change 3.10 y PIGF $p = 0.0305$, Fold-change 3.13). Aún más, la media de expresión de la Eng en endometriosis ovárica es de 4.5 (1.1 – 7.1) con respecto a la media en endometriosis profunda 3.3 (-1.4 – 6.8) y la expresión de Eng en endometriosis ovárica está 4 veces aumentada con respecto a la endometriosis profunda ($p = 0.0364$, Fold-change 4.67), mientras que no hubo diferencias entre dichos grupos para sFlt-1 y PIGF (figura 23 y tabla 19).

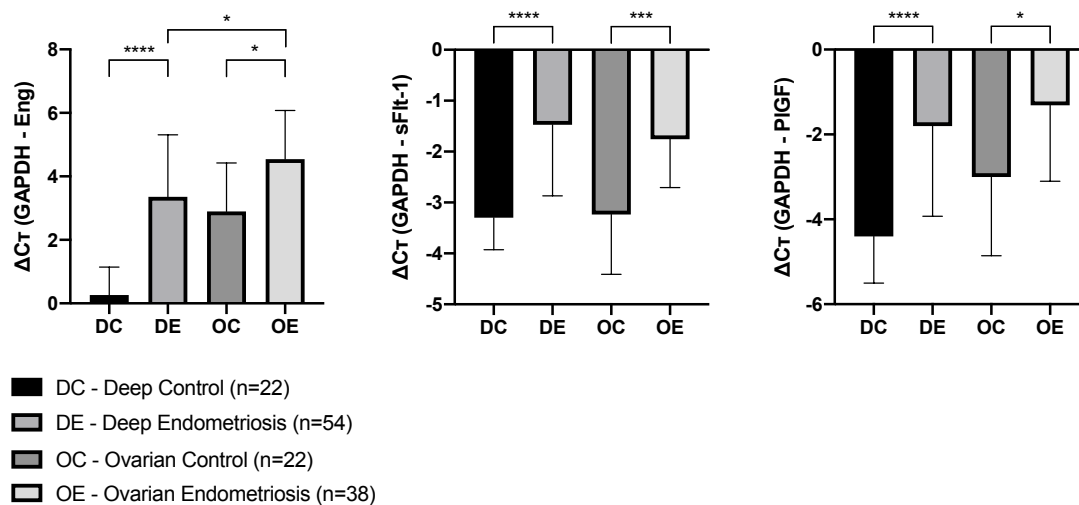


Figura 23. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes con endometriosis y controles. Se utilizó GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

	n	Controles profunda	n	Endometriosis profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	0.2 (-1.2 – 2.2)	54	3.3 (-1.4 – 6.8)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-4.3 – -2.1)	54	-1.4 (-4.6 – 1.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-4.4 (-6.6 – -2.5)	54	-1.8 (-6.9 – 1.9)	<0.0001
	n	Controles ovárica	n	Endometriosis ovárica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	2.8 (-1.6 – 5.2)	38	4.5 (1.1 – 7.1)	0.0142
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-5.6 – -1.7)	38	-1.7 (-4 – 0.1)	0.0004
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-3 (-6.3 – -0.1)	38	-1.3 (-4.8 – 1.7)	0.0305
	n	Endometriosis profunda	n	Endometriosis ovárica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	54	3.3 (-1.4 – 6.8)	38	4.5 (1.1 – 7.1)	0.0364
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	54	-1.4 (-4.6 – 1.4)	38	-1.7 (-4 – 0.1)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	54	-1.8 (-6.9 – 1.9)	38	-1.3 (-4.8 – 1.7)	>0.9999

Tabla 19. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico de pacientes control y endometriosis, así como sus subtipos (endometriosis profunda y endometriosis ovárica). En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima,

el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

5.3.3. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones

Como en los apartados anteriores, consideramos diferentes localizaciones de endometriosis por separado ya que pensamos que podrían tener un comportamiento diferente y por tanto una expresión de angiogénesis diferencial. Por un lado, separamos las pacientes con endometriosis profunda aislada y endometriosis profunda con adenomiosis, que se trató como un grupo diferente. Pacientes con adenomiosis tuvieron una tendencia hacia una menor expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF que la endometriosis ovárica o endometriosis profunda, aunque dicha expresión menor fue significativa únicamente para la Eng en adenomiosis respecto a la endometriosis ovárica (Figura 24A y tabla 20). Así, en endometriosis ovárica, la media de la expresión de Eng estaba en 4.5 (1.1 – 7.1) mientras que para la adenomiosis la expresión media de Eng estaba en 2 (-1.4 – 6.3), dicha disminución es estadísticamente significativa con valor $p = 0.0030$. Por otro lado, separamos pacientes con endometriosis profunda de las pacientes con endometriosis ovárica-profunda y comparamos si los factores angiogénicos se comportaban de manera similar a la endometriosis ovárica o a la profunda. No detectamos diferencias en sFlt-1 y PIGF, mientras que la Eng se expresó en menor cantidad en endometriosis ovárica-profunda en comparación con endometriosis ovárica, aunque dicha expresión fue similar a la endometriosis profunda (Figura 24B y Tabla 20). Así, en endometriosis ovárica la expresión media de Eng fue de 4.5 (1.1 – 7.1) mientras que en endometriosis ovárica-profunda estaba significativamente más baja y se situaba en 3.2 (-1.4 – 6.4) ($p = 0.0412$, Fold-change 0.57). Finalmente, la endometriosis profunda puede asociarse a afectación de diferentes órganos. Comparamos pacientes con endometriosis profunda con y sin afectación orgánica y observamos que, pacientes con endometriosis profunda con afectación orgánica muestran una expresión significativamente menor de Eng y PIGF que pacientes con endometriosis profunda sin afectación orgánica. La expresión media de Eng en

endometriosis con afectación orgánica estaba en 2.7 (-1.4 – 6.8), mientras que la expresión media de Eng en endometriosis sin orgánica estaba en 4.2 (2 – 6.4), dicha disminución es significativa con valor $p=0.0349$. De forma similar, la expresión media de PIGF en endometriosis con afectación orgánica estaba en -2.6 (-6.9 – 1.7), mientras que la expresión media de PIGF en endometriosis sin orgánica estaba en -0.6 (-4 – 1.9), dicha disminución es significativa con valor $p=0.0046$. Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas en sFlt-1, observamos una ligera tendencia hacia una menor expresión en pacientes con endometriosis profunda con afectación orgánica (expresión media de -1.8 (-4.4 – 0.8)) con respecto a endometriosis profunda sin orgánica (expresión media de -0.9 (-4.6 – 1.4)). (Figura 24C y Tabla 20).

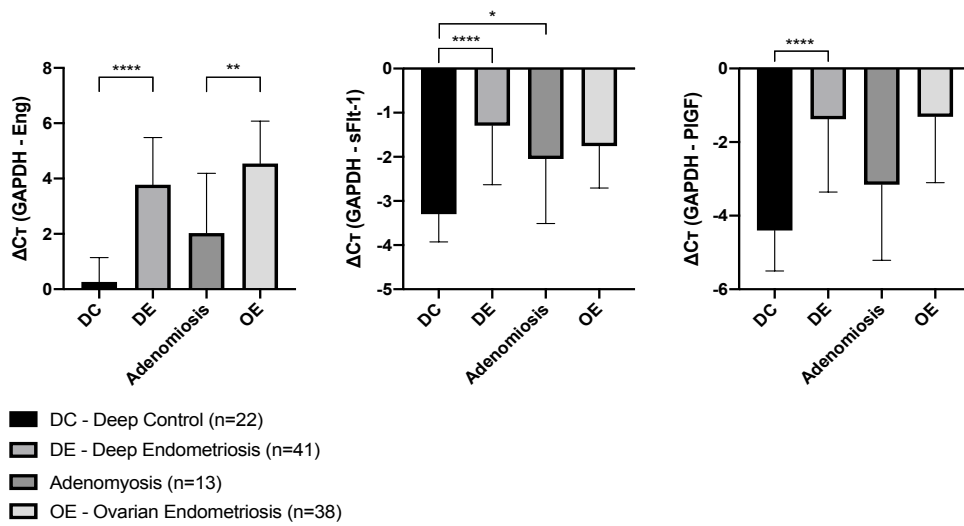
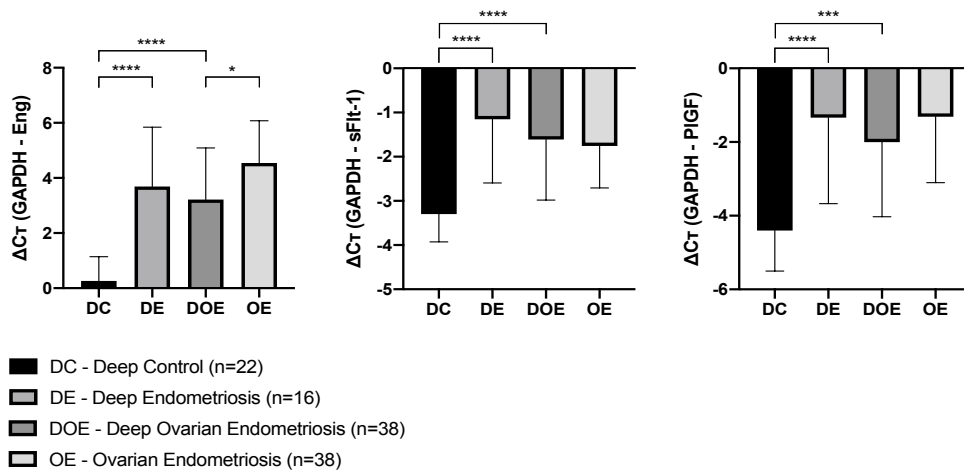
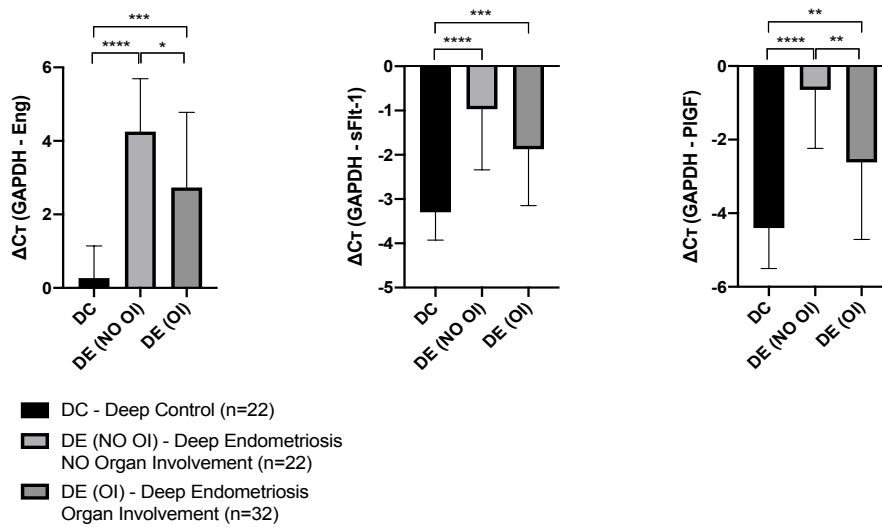
A**B****C**

Figura 24. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis de distintas localizaciones. **A.** Nivel de expresión

de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en pacientes control y adenomiosis. **B.** Nivel de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en pacientes control y endometriosis ovárica-profunda. **C.** Nivel de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en pacientes control y endometriosis con y sin afectación orgánica. Se utilizó GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

	n	Controles profunda	n	Adenomiosis	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	0.2 (-1.2 – 2.2)	13	2 (-1.4 – 6.3)	0.2023
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-4.3 – -2.1)	13	-2 (-4.4 – 1.4)	0.0329
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-4.4 (-6.6 – -2.5)	13	-3.1 (-6.9 – 0.2)	0.5242
	n	Controles profunda	n	Endometriosis ovárica-profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	0.2 (-1.2 – 2.2)	38	3.2 (-1.4 – 6.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-4.3 – -2.1)	38	-1.6 (-4.6 – 1.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-4.4 (-6.6 – -2.5)	38	-2 (-6.9 – 1.9)	0.0002
	n	Controles profunda	n	Endometriosis sin orgánica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	0.2 (-1.2 – 2.2)	21	4.2 (2 – 6.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-4.3 – -2.1)	21	-0.9 (-4.6 – 1.4)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-4.4 (-6.6 – -2.5)	21	-0.6 (-4 – 1.9)	<0.0001
	n	Controles profunda	n	Endometriosis con orgánica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	0.2 (-1.2 – 2.2)	32	2.7 (-1.4 – 6.8)	0.0001
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-4.3 – -2.1)	32	-1.8 (-4.4 – 0.8)	0.0005
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-4.4 (-6.6 – -2.5)	32	-2.6 (-6.9 – 1.7)	0.0093
	n	Adenomiosis	n	Endometriosis ovárica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	13	2 (-1.4 – 6.3)	38	4.5 (1.1 – 7.1)	0.0030
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	13	-2 (-4.4 – 1.4)	38	-1.7 (-4 – 0.1)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	13	-3.1 (-6.9 – 0.2)	38	-1.3 (-4.8 – 1.7)	0.0620
	n	Adenomiosis	n	Endometriosis profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	13	2 (-1.4 – 6.3)	41	3.7 (-0.4 – 6.8)	0.1086
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	13	-2 (-4.4 – 1.4)	41	-1.2 (-4.6 – 0.8)	0.3507
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	13	-3.1 (-6.9 – 0.2)	41	-1.3 (-5.8 – 1.9)	0.0623
	n	Endometriosis ovárica-profunda	n	Endometriosis ovárica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	38	3.2 (-1.4 – 6.4)	38	4.5 (1.1 – 7.1)	0.0412
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	38	-1.6 (-4.6 – 1.4)	38	-1.7 (-4 – 0.1)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	38	-2 (-6.9 – 1.9)	38	-1.3 (-4.8 – 1.7)	>0.9999

	n	Endometriosis ovárica-profunda	n	Endometriosis profunda	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	38	3.2 (-1.4 – 6.4)	16	3.6 (0.4 – 6.8)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	38	-1.6 (-4.6 – 1.4)	16	-1.1 (-3.1 – 0.8)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	38	-2 (-6.9 – 1.9)	16	-1.3 (-5.8 – 1.7)	>0.9999
	n	Endometriosis sin orgánica	n	Endometriosis con orgánica	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	21	4.2 (2 – 6.4)	32	2.7 (-1.4 – 6.8)	0.0349
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	21	-0.9 (-4.6 – 1.4)	32	-1.8 (-4.4 – 0.8)	0.0783
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	21	-0.6 (-4 – 1.9)	32	-2.6 (-6.9 – 1.7)	0.0046

Tabla 20. Niveles de expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y diferentes localizaciones de endometriosis, incluyendo endometriosis ovárica, endometriosis profunda, adenomiosis, endometriosis ovárica-profunda, endometriosis profunda sin afectación orgánica y endometriosis profunda con afectación orgánica. En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

5.3.4. Análisis de la expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado para evaluación de recurrencia

Algunas pacientes incluidas en el estudio tuvieron recurrencia de endometriosis, de esta forma extrajimos el RNA del episodio primario de endometriosis y de sus sucesivas recurrencias. Así, de 44 pacientes con endometriosis profunda y 31 con endometriosis ovárica, analizamos los factores angiogénicos de 54 muestras de endometriosis profunda y 38 muestras de endometriosis ovárica. Por un lado, comparamos la expresión de RNA entre 25 pacientes con endometriosis profunda primaria y 29 pacientes con endometriosis profunda recurrente. Encontramos aumento de la expresión de los factores angiogénicos en todos los casos de endometriosis en comparación con controles. Sin embargo, detectamos una tendencia hacia una menor expresión en la recurrencia (en comparación con episodio primario (Figura 25A y Tabla 21). Además, de 8 pacientes con endometriosis profunda, tuvimos 2 episodios consecutivos y pudimos confirmar que, efectivamente, los factores disminuyen en el episodio recurrente (Eng $p < 0.0001$, sFlt-1 $p = 0.0021$ y PIGF $p < 0.0001$ (Figura 25B y Tabla

21). Por otro lado, comparamos la expresión de RNA entre 30 episodios primarios de endometriosis ovárica y 8 episodios recurrentes de endometriosis ovárica. Igual que en la endometriosis profunda, todos los episodios de endometriosis ovárica mostraron una mayor expresión de factores angiogénicos en comparación con controles (Figura 26A y Tabla 21). Por el contrario, en el episodio recurrente observamos que hubo un aumento de la expresión de los factores analizados en comparación con el episodio primario. Sin embargo, no pudimos demostrar diferencias para ningún factor evaluando 2 episodios consecutivos de 8 pacientes con endometriosis ovárica (Figura 26B y Tabla 21).

	n	Control profunda	n	Profunda primaria	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	0.2 (-1.3 – 2.2)	25	3.6 (-0.8 – 6.6)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-4.3 – -2.1)	25	-1.2 (-3.6 – 0.8)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-4.4 (-6.6 – -2.5)	25	-1.2 (-5.3 – 1.5)	<0.0001
	n	Control profunda	n	Profunda recurrente	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	0.2 (-1.3 – 2.2)	29	3 (-1.4 – 6.8)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-4.3 – -2.1)	29	-1.6 (-4.6 – 1.4)	0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-4.4 (-6.6 – -2.5)	29	-2.2 (-6.9 – 1.9)	0.0018
	n	Control ovárica	n	Ovárica primaria	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	2.8 (-1.6 – 5.2)	30	4.2 (1.1 – 7.1)	0.0101
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-5.6 – -1.7)	30	-1.9 (-4 – -0.02)	0.0011
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-3 (-6.3 – -0.1)	30	-1.6 (-4.8 – 1.7)	0.0670
	n	Control ovárica	n	Ovárica recurrente	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	2.8 (-1.6 – 5.2)	8	5.4 (3.6 – 6.6)	0.0003
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-3.2 (-5.6 – -1.7)	8	-1.1 (-2 – 0.1)	<0.0001
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-3 (-6.3 – -0.1)	8	-0.1 (-2.2 – 1.7)	0.0012
	n	Profunda primaria sin recurrencia	n	Profunda primaria con recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	22	3.5 (-0.8 – 6.6)	3	4.7 (3.6 – 5.4)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	22	-1.2 (-3.6 – 0.8)	3	-1 (-1.8 – -0.04)	>0.9999
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	22	-1.3 (-5.3 – 1.5)	3	-0.6 (-1.9 – 0.02)	>0.9999
	n	Ovárica primaria sin recurrencia	n	Ovárica primaria con recurrencia	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	21	3.7 (1.1 – 5.7)	9	5.6 (3 – 7.1)	0.0141
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	21	-2.1 (-4 – -0.2)	9	-1.4 (-2.1 – -0.02)	0.1288
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	21	-2.2 (-4.8 – -0.07)	9	-0.09 (-2.6 – 1.7)	0.0172

	n	Ovárica primaria	n	Ovárica recurrente	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	30	4.2 (1.1 – 7.1)	8	5.4 (3.6 – 6.6)	0.1544
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	30	-1.9 (-4 – -0.02)	8	-1.1 (-2 – 0.1)	0.1633
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	30	-1.6 (-4.8 – 1.7)	8	-0.1 (-2.2 – 1.7)	0.1188
	n	Profunda primaria	n	Profunda recurrente	p-value
ΔC_T (GAPDH - Eng)	25	3.6 (-0.8 – 6.6)	29	3 (-1.4 – 6.8)	0.8438
ΔC_T (GAPDH - sFlt-1)	25	-1.2 (-3.6 – 0.8)	29	-1.6 (-4.6 – 1.4)	0.7510
ΔC_T (GAPDH - PIGF)	25	-1.2 (-5.3 – 1.5)	29	-2.2 (-6.9 – 1.9)	0.2741

Tabla 21. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control, endometriosis profunda primaria y recurrente y endometriosis ovárica primaria y recurrente. En la tabla se refleja el promedio de expresión de cada grupo con expresión mínima y máxima, el número de sujetos que se han tenido en cuenta para realizar cada comparación y con negrita se marcan los valores p que han sido estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

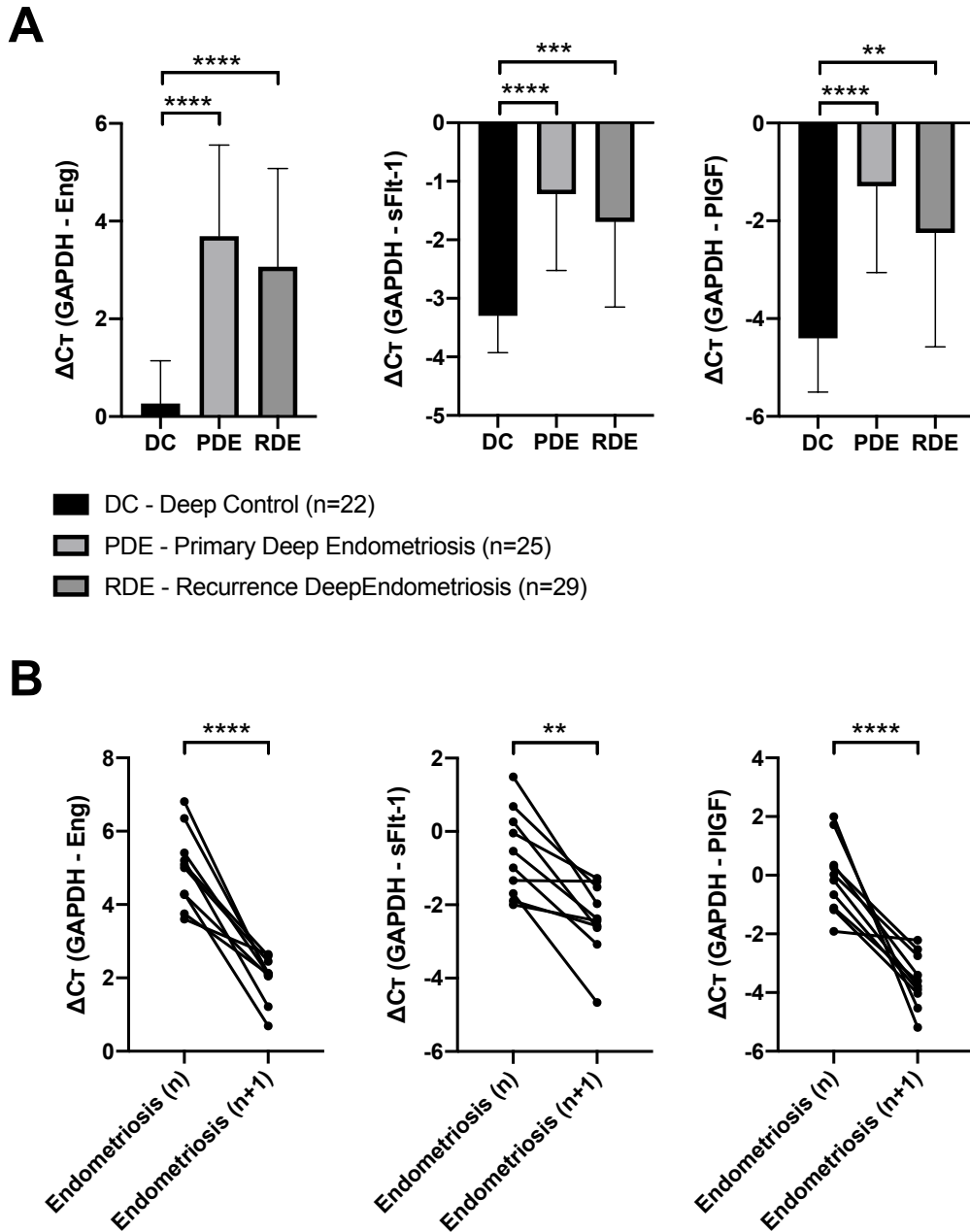


Figura 25. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PlGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis profunda primaria y recurrente. **A.** Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PlGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control (tejido retrocervical) y endometriosis profunda primaria y recurrente. **B.** Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PlGF en muestras emparejadas de endometriosis profunda de la misma paciente en 2 episodios consecutivos. Se utilizó GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

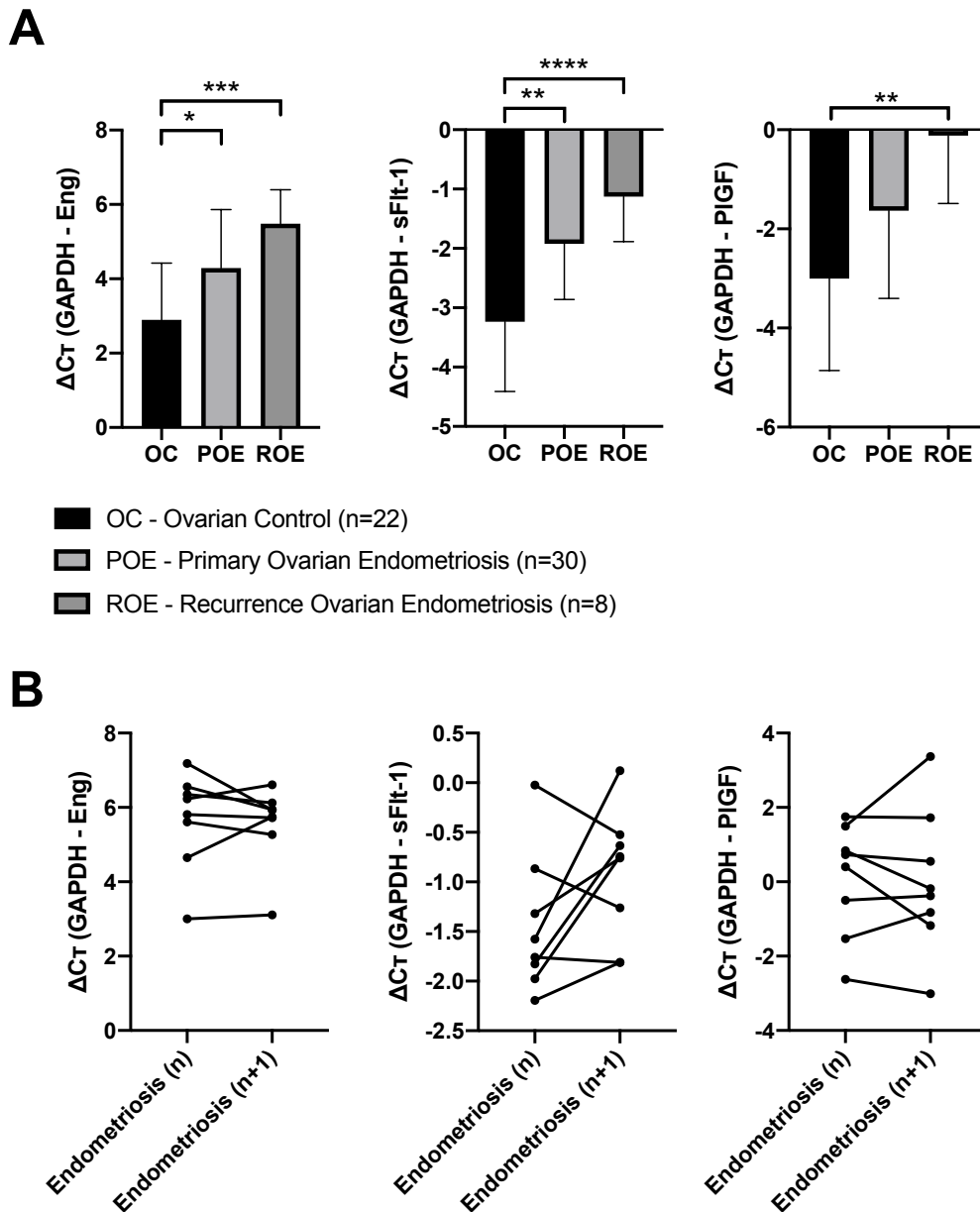


Figura 26. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis ovárica primaria y recurrente. **A.** Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control (quiste simple de ovario) y endometriosis ovárica primaria y recurrente. **B.** Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en muestras emparejadas de endometriosis ovárica de la misma paciente en 2 episodios consecutivos. Se utilizó GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

Considerando que hasta un 40-50% de endometriosis recurren a los 5 años, analizamos la expresión de RNA en el episodio primario de las endometriosis que recurren y las que no. En endometriosis profunda primaria, comparamos 22 pacientes sin recurrencia con 3 pacientes con recurrencia y no encontramos diferencias para ningún factor angiogénico. Sin embargo, se puede observar una ligera tendencia hacia una mayor expresión en los casos de recurrencia (Figura 27A y Tabla 21). En endometriosis ovárica, comparamos 21 pacientes sin recurrencia con 9 pacientes con recurrencia y encontramos que, Eng y PIGF estaban significativamente aumentados en los casos recurrentes (Figura 27B y Tabla 21). Así, la expresión media de la Eng en el grupo de endometriosis ovárica recurrente estaba en 5.6 (3 – 7.1) en comparación con la media de Eng en el grupo de endometriosis ovárica sin recurrencia 3.7 (1.1 – 5.7), dicho aumento de Eng en endometriosis ovárica recurrente respecto a la endometriosis ovárica no recurrente es estadísticamente significativo con valor $p=0.0141$. De manera similar, la expresión media de la PIGF en el grupo de endometriosis ovárica recurrente estaba en -0.09 (-2.6 – 1.7) y estaba significativamente más alta con valor $p=0.0172$ que la media de PIGF en el grupo de endometriosis ovárica sin recurrencia -2.2 (-4.8 – -0.07).

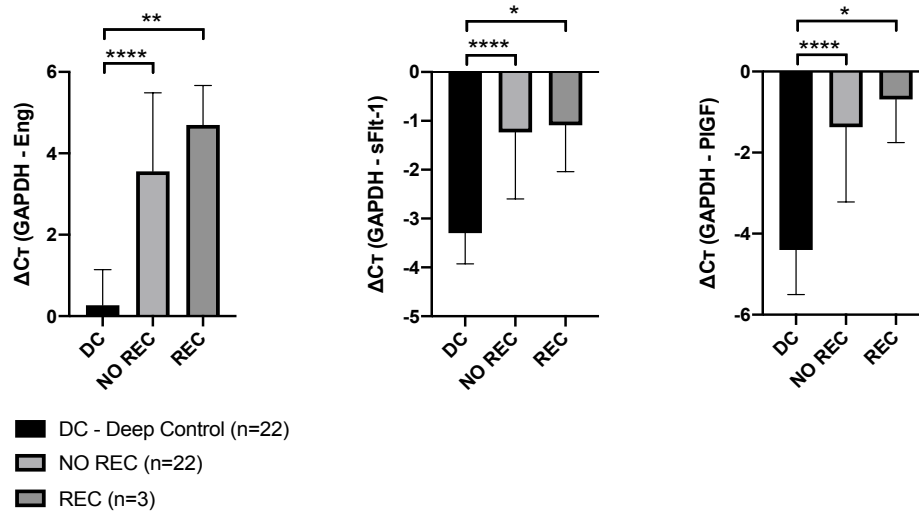
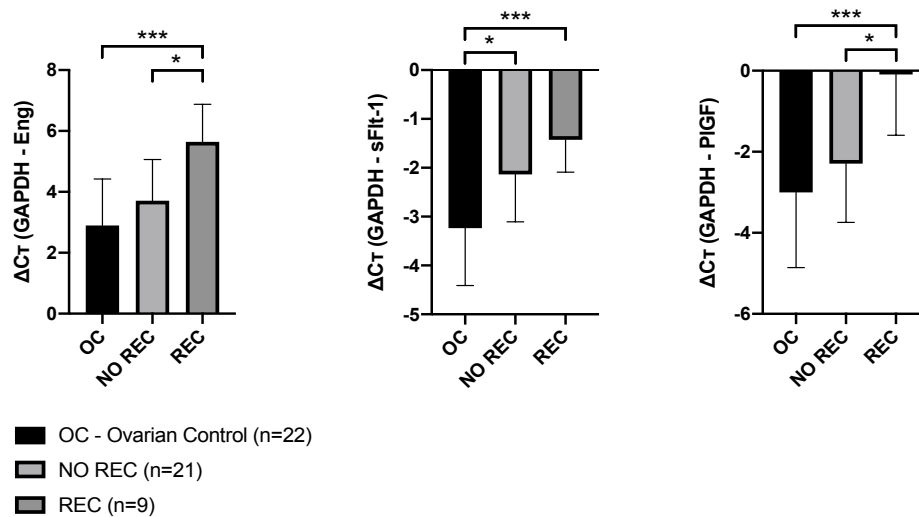
A**B**

Figura 27. Niveles de expresión de RNA de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de pacientes control y endometriosis primaria recurrente y no recurrente. Se utilizó GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión fueron analizados usando test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan como medias con desviaciones estándar. *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001

Finalmente, para evaluar la potencia de Eng, sFlt-1 y PIGF como biomarcadores pronósticos predictores de la recurrencia de endometriosis, analizamos valores individuales de AUC para cada factor (Figura 28). El análisis de las curvas ROC de Eng, sFlt-1 y PIGF en endometriosis profunda mostró resultados limitados con valores de 0.68, 0.51 y 0.63; mientras que el análisis de las curvas ROC en

endometriosis ovárica arrojó mejores resultados con valores de 0.87, 0.74 y 0.84, respectivamente.

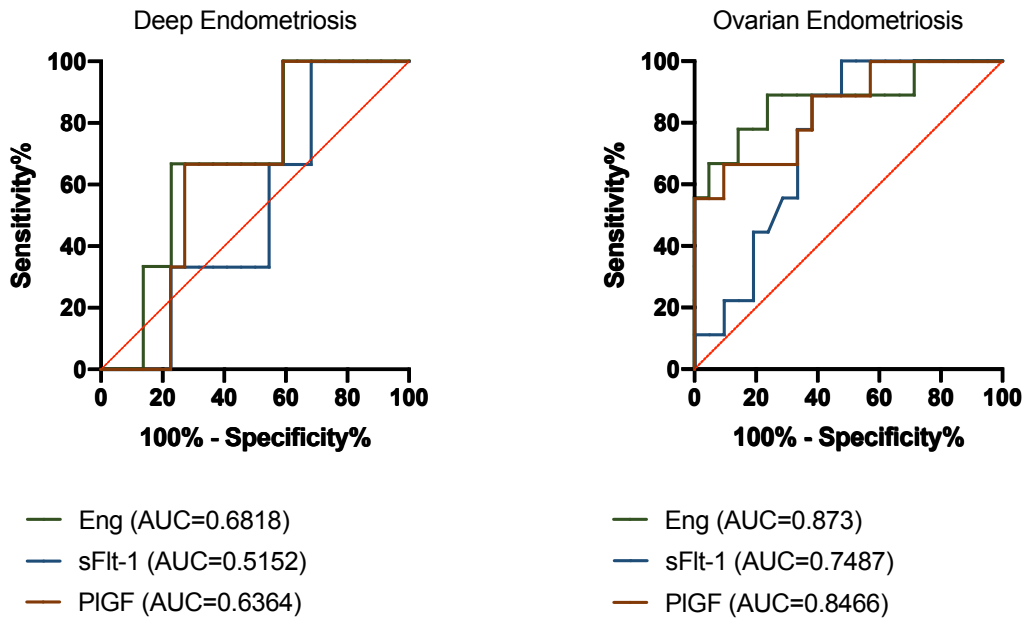


Figura 28. Curvas ROC para Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado de endometriosis primaria recurrente y no recurrente como factores pronósticos de la recurrencia.

Comparaciones ROC		AUC	Sensibilidad%	Especificidad%	p-value
Endometriosis profunda	<i>Eng</i>	0.6818	66.67	77.27	0.3156
	<i>sFlt-1</i>	0.5152	66.67	45.45	0.9334
	<i>PIGF</i>	0.6364	66.67	72.73	0.4517
Endometriosis ovárica	<i>Eng</i>	0.8730	88.89	76.19	0.0014
	<i>sFlt-1</i>	0.7487	88.89	61.90	0.0334
	<i>PIGF</i>	0.8466	88.89	61.90	0.0030

Tabla 22. Comparaciones ROC para reflejar la capacidad pronóstica de recurrencia de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico parafinado. La tabla refleja las comparaciones realizadas y proporciona la información de áreas bajo la curva ROC, sensibilidad, especificidad y significancia estadística de cada comparación.

6. DISCUSIÓN

La endometriosis se define como la presencia de glándulas endometriales y estroma en localizaciones extrauterinas (peritoneo, ovarios, recto y otros) y está asociada con dolor, infertilidad, dispareunia y empeoramiento de la calidad de vida⁴. En muchos casos, pacientes con endometriosis tardan años en ser diagnosticadas debido a la carencia de opciones de diagnóstico temprano, por falta de herramientas que predigan el pronóstico de la enfermedad y por la limitación de procedimientos terapéuticos⁹⁴. La media de tiempo entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico es alrededor de 7 años⁹⁵. A pesar de la disponibilidad de numerosos tratamientos médicos y de la cirugía, la resolución completa de la endometriosis por el momento no es posible. El tratamiento quirúrgico con la visualización directa de las lesiones y confirmación histológica de las piezas quirúrgicas hasta hace poco se ha considerado como el Gold standard para el diagnóstico y tratamiento de la endometriosis⁹⁶. Sin embargo, lesiones infiltrantes de endometriosis profunda son frecuentes y pueden estar localizadas en el retroperitoneo o en el septo rectovaginal, siendo de difícil diagnóstico, debido a que pueden pasar desapercibidas durante la laparoscopia. Además, la cirugía no está exenta de complicaciones y morbilidad. El tratamiento actual se centra en proporcionar el alivio de los síntomas, mejorar las tasas de embarazo y disminuir la recurrencia⁵⁴. A pesar de ello, las mujeres afectas de endometriosis frecuentemente tienen altas tasas de recurrencia y una larga historia clínica de morbilidad debido a la enfermedad o a los efectos secundarios de los tratamientos recibidos¹. La tasa de recurrencia puede ser variable dependiendo de la definición de la misma, situándose entre un 7%⁹⁷ hasta un 40-50% a los 5 años⁵⁶. El retraso en el diagnóstico es debido a la ausencia de signos patognomónicos y/o de biomarcadores diagnósticos de endometriosis. Dicho retraso es causa de inicio tardío del tratamiento, lo que conlleva aumento en las tasas de morbilidad, empeoramiento de calidad de vida y aumento de costes personales y socioeconómicos. Por todo ello, existe una gran necesidad de desarrollar técnicas diagnósticas precoces y poco invasivas para reducir el retraso en el diagnóstico y las consecuentes secuelas derivadas de dicho retraso. Debido a las altas tasas de incidencia de recurrencia y ausencia de biomarcadores pronósticos, la recurrencia es otro reto en la endometriosis. Descubrimiento de potenciales biomarcadores de recurrencia permitiría

identificar subgrupos de riesgo para individualizar el tratamiento y adecuar el seguimiento de pacientes en alto riesgo de recurrencia. Por tanto, evitar, retrasar o predecir la recurrencia sería beneficioso para los profesionales médicos y, sobre todo, para las pacientes y constituye a día de hoy una prioridad en la investigación de endometriosis.

Aunque la etiopatogénesis de endometriosis sigue siendo incierta, se conocen 4 mecanismos implicados en su desarrollo: la inflamación, el estrés oxidativo, la angiogénesis y la apoptosis. El estrés oxidativo y un desbalance entre factores pro-oxidantes y anti-oxidantes desencadenan el proceso inflamatorio, con el consiguiente aumento de factores inflamatorios tales como metaloproteinasas, citoquinas, interleuquinas, quemoquinas y prostaglandinas. NF- κ B es un regulador de la inflamación y apoptosis, el cual está elevado en pacientes con endometriosis, con consiguiente aumento de proliferación celular, de inflamación y disminución de la apoptosis. Se cree que la angiogénesis es el factor principal en el desarrollo de la endometriosis y en la supervivencia de implantes de endometrio ectópico, aun así, el mecanismo exacto de angiogénesis se desconoce. En la siguiente figura 28 se representan las diferentes vías que participan en la iniciación y progresión de las lesiones de endometriosis.

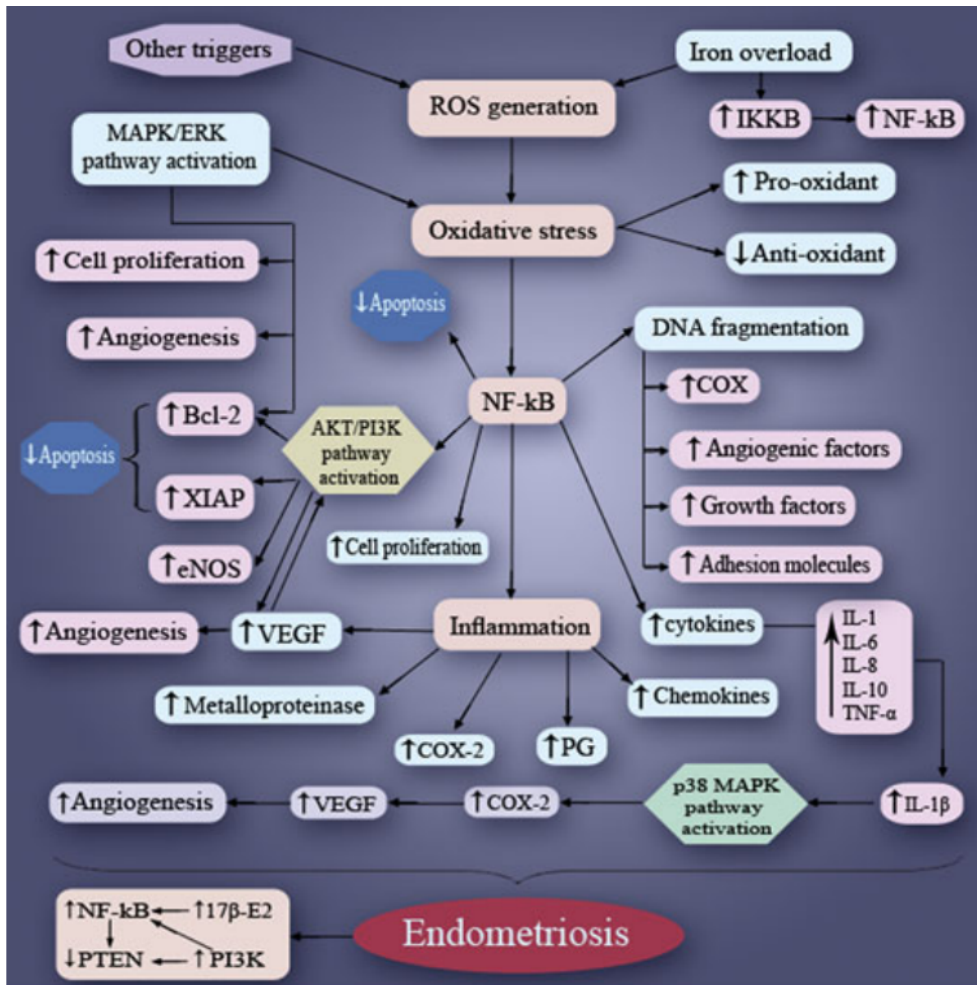


Figura 28. Vías de activación de endometriosis. Imagen de Samimi M. et al.⁹⁸

Existe una fuerte evidencia de que la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos, ejerce un papel fundamental en la patogénesis de endometriosis, participando en el desarrollo, mantenimiento y progresión de las lesiones⁹⁹. La activación de angiogénesis es compleja y depende de múltiples factores angiogénicos^{2,99,100}. Sin embargo, estudios sobre el papel de diferentes factores angiogénicos en endometriosis y su utilidad como biomarcadores de la enfermedad están en discordancia^{2,101}. sEng, sFlt-1 y PlGF han sido ampliamente estudiados en otras enfermedades angiogénicas, como la preeclampsia, no solo como biomarcadores sanguíneos en mujeres embarazadas, sino también como biomarcadores predictivos en mujeres con sospecha de preeclampsia⁷⁷.

De manera similar a los tumores, la endometriosis requiere neovascularización para el establecimiento de las lesiones, su proliferación e invasión de la matriz

extracelular. Múltiples estudios han demostrado un ambiente pro-angiogénico en fluido peritoneal^{82,85,102} y en tejido endometrial ectópico^{86,100,103}. Hasta la actualidad se han estudiado diversos factores angiogénicos, entre ellos, el factor más ampliamente descrito es el VEGF^{81-83,89,100,104,105}. Muchas de estas investigaciones han demostrado niveles aumentados de VEGF en endometriosis⁸¹⁻⁸³. A pesar de un amplio número de estudios sobre factores angiogénicos, su validez como biomarcadores de endometriosis aún no ha sido establecida.

VEGF ejerce su efecto biológico uniéndose a su receptor transmembrana de tirosin quinasa llamado VEGFR. Existen 3 tipos de VEGFR, el primer tipo llamado VEGFR1 también se conoce con el nombre de Flt-1. Recientemente ha sido descubierta la forma soluble de VEGFR1, llamada en inglés "soluble fms-like tyrosine kinase" (sVEGFR-1 o sFlt-1) que puede ser cuantificada en fluidos o tejidos.

sFlt-1

La forma soluble de Flt1 tiene efecto anti-angiogénico. Este factor está implicado en la angiogénesis y la vasculogénesis de enfermedades oncológicas y nefrológicas. Esta proteína actúa como un potente factor anti-angiogénico endógeno antagonista de dos factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PlGF)⁸⁸. sFlt-1 ejerce su efecto adhiriéndose a los dominios de unión de PlGF y VEGF, variando la configuración de estas proteínas. Esta situación impide su interacción con los receptores endoteliales de superficie y por tanto induce la disfunción endotelial¹⁰⁶. De los tres factores considerados en este trabajo, es el más ampliamente estudiado, en comparación con endoglina o PlGF, sin embargo, su interés clínico en endometriosis de momento es controvertido y no se ha podido trasladar a la práctica clínica como biomarcador de dicha enfermedad.

Endoglina

La endoglina es un receptor auxiliar de la familia de TGF- β proteínas. Se trata de una glicoproteína transmembrana que consiste de 2 variantes: L endoglina y S

endoglina¹⁰⁷. La familia de proteínas TGF- β participa en el desarrollo y proliferación celular, síntesis de matriz extracelular, angiogénesis y respuesta inmune, así como pueden ejercer la función de inhibición de proliferación celular y ser inductores de apoptosis. La endoglina puede contrarrestar estos efectos de la familia de TGF- β proteínas en varios tipos celulares. Así, en células cancerígenas la endoglina actúa como supresor tumoral en la fase premaligna de carcinogénesis, mientras que actúa como factor pro-angiogénico en la vasculogénesis tumoral, entre otros efectos. De forma similar a sFlt-1, existe una forma soluble de endoglina (sEng) que es una forma truncada de endoglina que contiene únicamente el dominio extracelular y también puede ser cuantificada en fluidos corporales. Contrariamente a la forma no soluble, la endoglina soluble es capaz de unirse y antagonizar los efectos pro-angiogénicos de la familia de proteínas TGF- β , por tanto, parece tener un efecto anti-angiogénico. sEng está implicada en la patogénesis de la preeclampsia¹⁰⁸. Este biomarcador soluble ha sido ampliamente estudiado y se sabe que sus niveles están aumentados en pacientes con preeclampsia⁹². Sin embargo, la forma soluble de endoglina aún no ha sido descrita en endometriosis.

PIGF

PIGF es otro miembro pro-angiogénico de la familia de VEGF. Ejerce su actividad biológica uniéndose competitivamente al VEGFR-1, de esta forma potenciando el efecto de VEGF, que a su vez está más disponible para unirse a su otro receptor, el VEGFR-2, que tiene una actividad tirosina quinasa aún más fuerte que el VEGFR-1. Pero este no es el único efecto de PIGF, que también es capaz de favorecer la transfosforilación intramolecular de VEGFR-2, lo que a su vez activa VEGFR-1 y en conjunto amplifican la respuesta cuando se produce la unión VEGF y VEGFR-2. Además, el papel de PIGF en angiogénesis patológica es controvertido, ya que puede formar heterodímeros con VEGF o unirse a sFlt-1, lo cual puede tener efectos tanto pro-angiogénicos como anti-angiogénicos^{109,110}.

En la bibliografía revisada se incluyen series cortas de 13 pacientes⁸⁶ evaluando PIGF, 20 pacientes para evaluar la expresión de Eng⁹¹ y 46 pacientes⁹⁰ para evaluar sFlt-1. El grupo de investigación de Gilabert, que evalúan la expresión de microRNAs y otros factores pro y antiangiogénicos en endometriosis en diferentes tejidos y muestras biológicas hablan de series de 14 pacientes¹¹¹ 22 pacientes¹¹², 58 pacientes¹¹³ y hasta 71 pacientes¹⁰³. Para la presente investigación y el cálculo de los tamaños de muestra para nuestro trabajo, nos hemos basado en los estudios previos, aunque existen pocas publicaciones al respecto.

El presente estudio fue diseñado para analizar si existen diferencias en la expresión de endoglina, sFlt-1 y PIGF entre mujeres con y sin endometriosis, en plasma, endometrio eutéptico y tejido endometriósico. De esta forma se pretendía identificar potenciales biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. El objetivo principal fue analizar la expresión de factores angiogénicos en plasma y endometrio eutéptico de pacientes con endometriosis para identificar potenciales biomarcadores diagnósticos. Los objetivos secundarios fueron analizar el comportamiento de los factores angiogénicos a nivel de tejido endometriósico para identificar el papel de la angiogénesis en endometriosis y para identificar biomarcadores pronósticos de recurrencia. Además, en aspirado uterino se pretendía identificar diferentes localizaciones de endometriosis en función de la expresión de factores angiogénicos e identificar posibles biomarcadores pronósticos de recurrencia.

Plasma

Comparamos los niveles plasmáticos de sEng, sFlt-1 y PIGF en pacientes con endometriosis y controles, hallando niveles elevados de sFlt-1 en endometriosis, especialmente en endometriosis ovárica. Estos hallazgos son consistentes con un estudio anterior en el cual mujeres con endometriosis tuvieron altos niveles de VEGF-A, sVEGFR-1 y Angiogenin-2 en suero y líquido peritoneal en comparación con controles sanos⁸⁹. Sin embargo, Cho et al.⁹⁰ y Artini et al.¹¹⁴ demostraron que niveles de VEGF y sFlt-1 en pacientes con endometriosis no se diferenciaban de pacientes controles, no obstante Cho et al. sugirió la

existencia de diferentes mecanismos angiogénicos en función de la severidad de la enfermedad, debido al hallazgo de sobreexpresión de sFlt-1 en pacientes con endometriosis mínima-moderada. Un estudio posterior del mismo grupo investigador mostró altos niveles de sFlt-1 en líquido peritoneal y tejido peritoneal, mientras que hubo niveles descendidos de sFlt-1 en endometrio eutópico de dichas pacientes¹⁰⁴, lo cual es consistente con nuestros hallazgos en el presente trabajo. Por otro lado, en nuestro estudio concluimos que sFlt-1 es el único biomarcador en sangre sensible para el diagnóstico de endometriosis general y endometriosis ovárica en particular. Esta conclusión se basa en un AUC de 0.7882 ($p=0.0139$), con sensibilidad del 76.47% y especificidad del 60% para endometriosis general y AUC de 0.8111 ($p=0.0222$), con un 77.78% de sensibilidad y especificidad del 60% para endometriosis ovárica. Contrariamente a nuestros resultados, nuestra hipótesis fue que sFlt-1 como factor anti-angiogénico estaría disminuido en endometriosis. Sorprendentemente, encontramos sus niveles aumentados y dado que se une e inactiva VEGF y PlGF, la sobreexpresión de sFlt-1 podría indicar la regulación a la baja del VEGF-A en casos de endometriosis menos severa, como se sugirió en una publicación anterior⁹⁰. En cuanto a sEng y PlGF, en nuestro estudio no observamos diferencias entre los diferentes grupos de endometriosis para estos factores analizados en plasma. El papel de PlGF en angiogénesis patológica es controvertido, ya que puede tener efectos pro- y anti-angiogénicos^{109,110}. Vodolazkaia et al.¹¹⁵ demostraron en su estudio que niveles plasmáticos de PlGF y sFlt-1 son comparables entre pacientes con endometriosis y controles. Por el contrario, Zucchini et al.⁸⁶ publicó un estudio mostrando niveles elevados de PlGF en plasma de pacientes con endometriosis ovárica en comparación con controles. De forma similar a nuestros resultados, Cho HY et al.¹¹⁶ midió la cantidad de CYFRA 21-1 y PlGF sérico en pacientes con endometriosis ovárica y describió que sus niveles eran similares a las pacientes sanas. Por último, la endoglina soluble, igual que sFlt-1, parece tener un efecto anti-angiogénico, ya que inhibe los efectos pro-angiogénicos de la familia de proteínas TGF- β ¹¹⁷. En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de sEng fueron comparables entre el grupo control y endometriosis y para nuestro conocimiento, este es el primer estudio en analizar el comportamiento de sEng plasmática en pacientes con endometriosis.

También, evaluamos la concentración proteica de sEng, sFlt-1 y PlGF en muestras de plasma en diferentes episodios de recurrencia. Observamos una sobreexpresión de sFlt-1 en endometriosis primaria, mientras que en endometriosis recurrente hubo una disminución de dicho biomarcador y sus niveles eran similares al grupo control. En referencia a sEng y PlGF, no observamos diferencias en la expresión en plasma de dichos factores entre los diferentes grupos de recurrencia.

Aspirado endometrial

En segundo lugar, comparamos la expresión de Eng, sFlt-1 y PlGF a nivel de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y controles. Como se ha explicado previamente, se ha demostrado que los implantes endometriósicos, especialmente las lesiones en el estadio de desarrollo temprano, sintetizan un amplio rango de proteínas pro-angiogénicas y expresan niveles bajos de inhibidores angiogénicos⁷⁴. Otros estudios también señalan que existe un comportamiento diferencial entre endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y mujeres sanas^{104,105,118}. Así, parece haber un desbalance entre la angiogénesis y la expresión de factores angiogénicos en el endometrio de pacientes con endometriosis.

Eng

La Eng se puede comportar de manera diferente dependiendo del estadio de la enfermedad¹⁰⁷. Por ejemplo, en células cancerígenas, la Eng actúa como supresor tumoral en el estadio premaligno de la carcinogénesis, mientras es un potente factor pro-angiogénico a nivel de vasculogénesis tumoral. Kim et al⁹¹ demostró que el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis tenía una expresión aumentada de endoglina, sugiriendo que la endoglina podría ser un marcador sensible de la angiogénesis. Para dicho estudio Kim et al. usó tejido endometrial de pacientes con endometriosis fijado en formalina y parafinado y realizó una inmunohistoquímica mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales para la endoglina, contó el número de vasos sanguíneos en función de los vasos marcados con endoglina. Los resultados fueron clasificados

según diferentes fases del ciclo menstrual. Así, la sobreexpresión de Eng se observó únicamente en fase secretora tardía, sugiriendo de este modo que el ciclo menstrual influye en la expresión de factores angiogénicos.

Fujishita et al.¹¹⁹ observó la expresión de endoglina en tejido estromal de endometrio y tejido conectivo de lesiones endometriósicas de peritoneo pélvico, sin embargo, no hubo expresión de endoglina en el epitelio glandular endometrial o de tejido endometriósico. A diferencia del estudio de Fujishita, Hayrabedian et al.¹²⁰. no observó expresión de endoglina en endometrio de pacientes sanas, mientras que en adenomiosis y endometriosis ovárica, la endoglina se expresaba en todos los microvasos y la expresión aumentaba en el miometrio. Una expresión débil de endoglina se detectó en endometrio eutópico de diferentes casos de endometriosis¹²⁰. Contrariamente a la literatura, donde se ha propuesto un papel pro-angiogénico de la Eng, en nuestro estudio encontramos niveles significativamente más bajos de Eng en aspirados endometriales de pacientes con endometriosis. Además, analizando los diferentes subtipos de endometriosis y diferente afectación orgánica, observamos que la endometriosis profunda (con o sin afectación orgánica) y endometriosis ovárica mostraron niveles significativamente disminuidos de Eng, mientras que las pacientes con adenomiosis y endometriosis ovárica-profunda tuvieron niveles de Eng similares al grupo control.

En cuanto a la recurrencia, los niveles de Eng en aspirado endometrial estaban disminuidos en endometriosis con o sin recurrencia en comparación con el grupo control. Sin embargo, en endometriosis profunda, únicamente observamos diferencias estadísticamente significativas en el grupo de endometriosis no recurrente, mientras que, en endometriosis ovárica, no observamos diferencias debido al bajo número de pacientes. De manera global, observamos una tendencia en endometriosis sin recurrencia a expresar menor cantidad de Eng que las pacientes sanas y la endometriosis con recurrencia expresa aún menos Eng que los otros dos grupos.

En definitiva, en el presente estudio encontramos niveles bajos de Eng en aspirados endometriales de pacientes con endometriosis y este hecho podría tener al menos tres posibles explicaciones. Por un lado, el papel de la endoglina en endometriosis es aún incierto, si se asumiera que su efecto en endometriosis es similar al papel que desarrolla en la fase premaligna de carcinogénesis,

entonces niveles bajos de endogлина podrían explicar una menor supresión de crecimiento celular en endometriosis y por tanto favorecer su desarrollo. Por otro lado, el endometrio normal consiste de una capa de epitelio columnar, glándulas endometriales y estroma. Fujishita et al¹¹⁹. demostró la expresión de endogлина únicamente en estroma endometrial, de este modo, los niveles de endogлина podrían depender de la cantidad de estroma obtenido en la muestra tisular de biopsias endometriales. Además, los niveles de Eng en endometrio eutópico no reflejan directamente los niveles de Eng en tejido endometriósico, por el contrario, como se mencionará más adelante, los niveles de Eng en tejido endometriósico están aumentados y sus niveles en aspirado endometrial son bajos, por tanto, la expresión de Eng varía en función del tejido. Por último, los niveles de factores angiogénicos pueden verse influenciados por el ciclo menstrual.

sFlt-1

Teniendo en cuenta el supuesto efecto anti-angiogénico de sFlt-1, nuestra hipótesis fue que este factor estaría disminuido en endometriosis. Según lo esperado, encontramos que niveles de sFlt-1 están disminuidos en endometrio eutópico de pacientes con endometriosis en comparación con mujeres sanas. Estos hallazgos son consistentes con el único estudio que evalúa la expresión de sFlt-1 en tejido endometrial eutópico¹⁰⁴, en el cual la expresión de sFlt-1 estaba disminuida en endometrio de pacientes con endometriosis con respecto a controles. En la presente investigación también encontramos niveles significativamente más bajos de sFlt-1 a nivel de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis profunda y ovárica respecto a pacientes control. Sin embargo, no encontramos diferencias en la expresión de sFlt-1 en aspirado endometrial de pacientes con adenomiosis que tienen niveles similares al grupo control. Además, los niveles de expresión de sFlt-1 en aspirado endometrial fueron significativamente más bajos en endometriosis ovárica profunda y en endometriosis profunda con afectación orgánica, sugiriendo que es un factor que podría estar relacionado con la severidad de endometriosis.

En cuanto a la recurrencia, sFlt-1 fue significativamente disminuido en aspirado endometrial de endometriosis recurrente y no recurrente en comparación con

casos control. Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los casos recurrentes y no recurrentes, detectamos que en los casos recurrentes hubo una expresión aún menor que en los casos no recurrentes. Estos resultados fueron similares para subgrupo de endometriosis ovárica y endometriosis profunda, sugiriendo que las recurrencias se desarrollan en un ambiente más pro-angiogénico.

PIGF

Resultados de dos estudios (Suzumori et al⁸⁵ and Zucchini et al⁸⁶) reportaron niveles aumentados de PIGF en fluido peritoneal de pacientes con endometriosis y en sangre de pacientes con endometriosis ovárica, respectivamente. Vodolazkaia et al.¹¹⁵ mostró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de PIGF y polimorfismos de nucleótido único en el gen de PIGF. Un único estudio describe la expresión de RNA de PIGF en tejido endometrial, donde no se observaron diferencias significativas entre aspirados endometriales de pacientes con endometriosis y controles¹⁰³. Nuestro estudio por primera vez describe un comportamiento diferencial de este biomarcador en endometrio eutópico. Observamos niveles de PIGF significativamente más bajos en aspirado endometrial de pacientes con endometriosis en comparación con el grupo control. Dicha disminución fue objetivada en endometriosis profunda, endometriosis ovárica y endometriosis ovárica-profunda, pero no en adenomiosis.

En endometriosis recurrente, hubo una menor expresión de PIGF en aspirados endometriales de pacientes con endometriosis con o sin recurrencia en comparación con endometrio de pacientes sanas. Dichas diferencias también se observaron en endometriosis profunda y endometriosis ovárica por separado, con una tendencia hacia una menor expresión en los casos recurrentes.

Tejido endometriósico

En tercer lugar, analizamos la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF a nivel de tejido endometriósico y lo comparamos con controles sin endometriosis. Todos los biomarcadores analizados fueron significativamente elevados en comparación con controles (endometriosis ovárica vs quiste simple de ovario y endometriosis

profunda vs tejido retrocervical). Niveles aumentados de Eng en endometriosis ovárica con respecto a endometriosis profunda permite diferenciar estas dos formas de la enfermedad. El grupo de adenomiosis tuvo niveles sobreexpresados de sFlt-1 en comparación con controles, sin embargo, en comparación con endometriosis profunda o endometriosis ovárica, hubo niveles disminuidos de Eng. En general, parece que en adenomiosis hay un aumento de los 3 factores respecto a los controles, sin embargo, en comparación con endometriosis ovárica y profunda, en adenomiosis dichos factores se expresan en menor cantidad. Endometriosis ovárica-profunda mostró mayores niveles de todos los factores analizados en comparación con controles y tiene una expresión similar de sFlt-1 y PIGF que la endometriosis ovárica o endometriosis profunda. Únicamente, niveles más bajos de Eng en endometriosis ovárica-profunda en comparación con endometriosis profunda permiten diferenciar dichas afectaciones. En referencia a endometriosis y afectación orgánica, la endometriosis sin afectación orgánica tiene una expresión aumentada de todos los factores respecto a pacientes control y de Eng y PIGF respecto a la endometriosis sin afectación orgánica.

Eng

Acorde con nuestros hallazgos, está descrito que la endoglina está elevada en endometrio eutópico y ectópico^{91,119,121}. Recientemente, Chen et al.¹²² publicó un artículo describiendo niveles sobre-elevados de Eng en tejido endometriósico en comparación con endometrio eutópico normal. Savilova et al.¹²³ también demostró un incremento en la expresión de Eng en endometrio ectópico de pacientes con endometriosis en comparación con endometrio eutópico de pacientes sin endometriosis. Por tanto, parece que la expresión de Eng a nivel de tejido ectópico es mayor que en endometrio eutópico, pero a pesar de todos estos hallazgos, el papel de la Eng en endometriosis aún está por esclarecer.

sFlt-1

Los niveles de sFlt-1 en tejido endometriósico también son consistentemente altos a lo largo de los estudios existentes^{104,114} y concuerdan con nuestros

resultados. Artini et al.¹¹⁴ en 2008 analizó los niveles de VEGF y sFlt-1 en sangre, líquido peritoneal, líquido intraquístico y en tejido endometriósico de pacientes con endometrioma, cistoadenoma y cistoadenocarcinoma. Estos investigadores encontraron una expresión incrementada de VEGF y sFlt-1 en endometriosis en comparación con controles. Cho SH et al.¹⁰⁴ publicó en 2012 que lesiones endometriósicas peritoneales tienen niveles significativamente más elevados de sFlt-1 que los controles (2.53-fold vs 1.68-fold, $p=0.046$). Ellos concluyeron que la anormal expresión de factores angiogénicos en tejido endometriósico peritoneal y en endometrio eutópico puede estar relacionada con la patogénesis de endometriosis.

PIGF

Como se ha mencionado previamente, PIGF es un factor pro-angiogénico, pero su papel en la angiogénesis patológica es controvertido, ya que puede tener efectos pro- y anti-angiogénicos. Zucchini et al.⁸⁶ y Suzumori et al.⁸⁵ describieron cantidades aumentadas de PIGF en líquido peritoneal y en sangre de pacientes con endometriosis. Vodolazkaia et al.¹¹⁵ publicó la existencia de una asociación entre niveles plasmáticos de PIGF y polimorfismos de nucleótido único en el gen de PIGF. Cho HY et al.¹¹⁶ midió la cantidad de CYFRA 21-1 y PIGF sérico en pacientes con endometriosis ovárica y describió que sus niveles eran similares a las pacientes sanas, sin embargo, sugirió que los marcadores CYFRA 21-1 y PIGF podrían ser prometedores para el diagnóstico de endometriosis ovárica. Sin embargo, no hay estudios previos que analicen la expresión de PIGF a nivel de endometrio ectópico, por lo que nuestro trabajo por primera vez describe el comportamiento de esta proteína en tejido peritoneal endometriósico de diferentes tipos de endometriosis y los compara con mujeres sin endometriosis.

Recurrencia

En la literatura, se han reportado tasas de recurrencia que pueden alcanzar entre un 50% y un 90%¹²⁴. La tasa de las recurrencias puede llegar a ser muy alta, dependiendo de la definición de recurrencia y su manejo es un reto para los profesionales y las pacientes. Así, Weir et al.⁵⁸ en su artículo describió que la

probabilidad de reingreso para un nuevo tratamiento quirúrgico dentro de los 4 primeros años tras la primera cirugía fue del 25% y 1 de cada 10 pacientes terminaría con histerectomía. Cheong et al.⁵⁷ reportó tasas más altas de reintervención (51% a los 10 años), donde la mitad de las pacientes tuvieron 1 reintervención y la otra mitad de 2 a 4 reintervenciones. Además, alrededor del 50% de mujeres sometidas a tratamiento quirúrgico necesitan analgésicos o terapia hormonal durante 2 años posteriores para el manejo del dolor⁴⁰. De este modo, la recurrencia sigue siendo una condición de difícil manejo y una identificación de biomarcadores de la recurrencia permitiría detectar subgrupos de riesgo para ofrecer un tratamiento más individualizado y un adecuado control postquirúrgico. Por ello, evaluamos los factores angiogénicos en tejido endometriósico teniendo en cuenta los diferentes episodios de recurrencia. Para la endometriosis profunda, encontramos que, todos los factores fueron más bajos en endometriosis recurrente en comparación con endometriosis primaria. Por el contrario, en endometriosis ovárica, encontramos que, todos los factores fueron aumentados en la recurrencia en comparación con el episodio primario. De este modo, identificamos que la Eng, sFlt-1 y PIGF son potenciales biomarcadores predictivos de la recurrencia ovárica. Para ello, evaluamos dichos factores a nivel de endometriosis primaria ovárica y comparamos aquellas pacientes que sabíamos que iban a recurrir con aquellas que no habían recurrido durante el seguimiento, obteniendo valores AUC de 0.87, 0.74 y 0.84 respectivamente. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF a nivel de tejido endometriósico de diferentes episodios de recurrencia. En la literatura revisada, un único estudio describe el factor angiogénico SLIT/ROBO1 elevado en endometriosis ovárica como biomarcador de recurrencia¹²⁵.

7. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

La novedad de nuestro estudio se basa en la determinación de sEng en plasma de paciente con endometriosis y en realizar el análisis de Eng, sFlt-1 y PIGF en dichas pacientes y compararlos con controles. Más aún, para nuestro conocimiento, este estudio es el primero en diferenciar factores angiogénicos dependiendo de su localización, afectación orgánica y recurrencia, ya que se han analizado los siguientes grupos: endometriosis ovárica, endometriosis profunda, endometriosis ovárica-profunda, endometriosis profunda con adenomiosis y endometriosis con y sin afectación orgánica. Además, también es la primera vez que se describe la expresión de Eng, sFlt-1 y PIGF teniendo en cuenta la endometriosis recurrente y no recurrente.

Una posible limitación a nuestro trabajo es el escaso tamaño muestral. El estudio actual pretende evaluar múltiples variables (3 factores angiogénicos en diferentes subgrupos de la enfermedad y en diferentes muestras, para evaluar biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la recurrencia), lo que supondría calcular el tamaño de muestra para cada comparación que se realice, por lo que estudios de este tipo no suelen hacer el cálculo del tamaño muestral y hemos basado la elección de nuestro número de muestra en los estudios anteriormente publicados. Debido al limitado tamaño muestral, al realizar los análisis por diferentes subgrupos de endometriosis, frecuentemente no obtuvimos significancia estadística.

Otro punto que podría generar debate, es que las pacientes del presente estudio no fueron clasificadas según la clasificación de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM)²⁶ como lo hicieron algunos estudios previos^{89,90,104,115}. Este hecho se debe principalmente a que la clasificación ASRM es una clasificación quirúrgica y en nuestra investigación estamos buscando una herramienta poco invasiva de diagnóstico, por lo que utilizamos una clasificación meramente clínica; por otro lado, dicha clasificación no se correlaciona con los síntomas ni con la severidad de la enfermedad³⁰.

Muchos estudios han reportado que la actividad angiogénica depende del estatus o ciclo hormonal^{85,91,115,119,126}, mientras que otros afirman que no encuentran dicha asociación^{127,128}. Esta cuestión está en controversia y se

desconoce el impacto de la fase menstrual en angiogénesis. De este modo, nuestros resultados podrían verse afectados parcialmente por las variaciones hormonales debido al ciclo menstrual, sin embargo, en nuestro estudio no se pudo realizar estratificación de grupos por fases menstruales debido a dos motivos: por un lado, por la escasez del tamaño muestral y la diferenciación de los diferentes subgrupos de endometriosis, habrían quedado muy pocas pacientes por cada grupo, y por otro lado, porque en la mayoría de los casos desconocíamos la fase del ciclo menstrual de las mujeres incluidas en el estudio.

Finalmente, todas las muestras de tejido en nuestro estudio fueron fijadas en formalina y parafinadas. La extracción de RNA de dichas muestras es muchas veces compleja y puede empeorar seriamente la calidad y la cantidad del RNA¹²⁹. Aunque nuestros resultados podrían estar ligeramente afectados por la parafina, uno de los puntos fuertes de este estudio es la extracción exitosa del RNA de las muestras de tejido parafinadas.

8. CONCLUSIONES

Plasma

sFlt-1 está aumentado en plasma de pacientes con endometriosis, especialmente en endometriosis ovárica y es un potencial biomarcador diagnóstico.

Endometrio eutópico

A nivel de endometrio eutópico existe una disminución generalizada de Eng, sFlt-1 y PIGF en pacientes con endometriosis, dichos factores son potenciales biomarcadores diagnósticos.

La disminución de Eng, sFlt-1 y PIGF en endometrio eutópico de pacientes con endometriosis es independiente del subtipo y de la afectación orgánica.

En adenomiosis los factores angiogénicos estudiados a nivel de endometrio eutópico se comportan de forma similar a los controles, por lo que creemos que dicho grupo debería de ser tratado como un grupo aislado.

Existe una disminución de Eng, sFlt-1 y PIGF en endometrio eutópico de pacientes que recurren respecto a la no recurrencia.

Endometrio ectópico

Existe un aumento generalizado de Eng, sFlt-1 y PIGF a nivel de tejido endometriósico ectópico.

Existe una disminución de Eng, sFlt-1 y PIGF en tejido endometriósico de pacientes que recurren respecto a la endometriosis primaria.

Hay un comportamiento diferencial de Eng, sFlt-1 y PIGF a nivel de lesión endometriósica primaria y dichos factores son potenciales biomarcadores predictores de la recurrencia, especialmente en endometriosis ovárica.

Este estudio demuestra que en endometriosis existe un desbalance en factores pro- y anti-angiogénicos y que son necesarios más estudios para una mejor comprensión del papel de la angiogénesis en endometriosis.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2010;362(25):2389-2398. doi:10.1056/NEJMcp1000274
2. Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):9. Published 2018 Jul 19. doi:10.1038/s41572-018-0008-5
3. Goldstein DP, deCholnoky C, Emans SJ, Leventhal JM. Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J Reprod Med*. 1980;24(6):251-256.
4. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24(2):235-258. doi:10.1016/S0889-8545(05)70302-8
5. Mason BR, Chatterjee D, Menias CO, Thaker PH, Siegel CL, Yano M. Encyclopedia of endometriosis: a pictorial rad-path review. *Abdom Radiol (NY)*. 2020;45(6):1587-1607. doi:10.1007/s00261-019-02381-w
6. Ballard KD, Seaman HE, de Vries CS, Wright JT. Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study - Part 1. *BJOG*. 2008;115(11):1382-1391. doi:10.1111/j.1471-0528.2008.01878.x
7. Guía de atención a las mujeres con endometriosis en el Sistema Nacional de Salud (SNS). Published online 2013. <https://www.mscbs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/equidad/ENDOMETRIOSIS.pdf>
8. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364(9447):1789-1799. doi:10.1016/S0140-6736(04)17403-5
9. Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril*. 2009;92(1):68-74. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.04.056
10. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres [published correction appears in *Hum Reprod*. 2014 Sep;29(9):2073]. *Hum Reprod*. 2012;27(5):1292-1299. doi:10.1093/humrep/des073
11. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009;360(3):268-279. doi:10.1056/NEJMra0804690

12. Bedaiwy MA. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod.* 2002;17(2):426-431. doi:10.1093/humrep/17.2.426
13. Mansour G, Aziz N, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertil Steril.* 2009;92(1):61-67. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.05.048
14. Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS. Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril.* 2008;89(5):1064-1068. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.04.048
15. Hudelist G, English J, Thomas AE, Tinelli A, Singer CF, Keckstein J. Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound for non-invasive diagnosis of bowel endometriosis: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(3):257-263. doi:10.1002/uog.8858
16. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98(3):511-519. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.06.029
17. Sourial S, Tempest N, Hapangama DK. Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int J Reprod Med.* 2014;2014:179515. doi:10.1155/2014/179515
18. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984;64(2):151-154.
19. Burney RO, Giudice LC. Reprint of: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2019;112(4Suppl1):e153-e161. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.08.083
20. Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:106-115. doi:10.1196/annals.1434.014
21. Hey-Cunningham AJ, Fazleabas AT, Braundmeier AG, Markham R, Fraser IS, Berbic M. Endometrial stromal cells and immune cell populations within lymph nodes in a nonhuman primate model of endometriosis. *Reprod Sci.* 2011;18(8):747-754. doi:10.1177/1933719110397210

22. Hey-Cunningham AJ, Peters KM, Zevallos HB villa, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Angiogenesis, lymphangiogenesis and neurogenesis in endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013;5:1033-1056. doi:10.2741/e682
23. Troncon JK, Zani AC, Vieira AD, Poli-Neto OB, Nogueira AA, Rosa-E-Silva JC. Endometriosis in a patient with mayer-rokitansky-küster-hauser syndrome. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2014;2014:376231. doi:10.1155/2014/376231
24. Taguchi S, Enomoto Y, Homma Y. Bladder endometriosis developed after long-term estrogen therapy for prostate cancer. *Int J Urol*. 2012;19(10):964-965. doi:10.1111/j.1442-2042.2012.03064.x
25. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Michels KB, Hunter DJ. In utero exposures and the incidence of endometriosis. *Fertil Steril*. 2004;82(6):1501-1508. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.04.065
26. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997 May;67(5):817-21. doi: 10.1016/s0015-0282(97)81391-x. PMID: 9130884.
27. Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, et al. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralbl Gynakol*. 2005;127(5):275-281. doi:10.1055/s-2005-836904
28. Haas D, Wurm P, Shamiyeh A, Shebl O, Chvatal R, Oppelt P. Efficacy of the revised Enzian classification: A retrospective analysis. Does the revised Enzian classification solve the problem of duplicate classification in rASRM and Enzian? *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287(5):941-945. doi:10.1007/s00404-012-2647-1
29. Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: The new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril*. 2010;94(5):1609-1615. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.09.035
30. Andres MP, Borrelli GM, Abrão MS. Endometriosis classification according to pain symptoms: can the ASRM classification be improved? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;51:111-118. doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.06.003
31. Nisolle M, Donnez J. Reprint of: Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are

- three different entities. *Fertil Steril*. 2019;112(4):e125-e136. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.08.081
32. Hsu AL, Khachikyan I, Stratton P. Invasive and noninvasive methods for the diagnosis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53(2):413-419. doi:10.1097/GRF.0b013e3181db7ce8
 33. Rolla E. Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Res*. 2019;8:F1000 Faculty Rev-529. Published 2019 Apr 23. doi:10.12688/f1000research.14817.1
 34. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A. An endometriosis classification, designed to be validated. *Gynecol Surg*. 2011;8(1):1-6. doi:10.1007/s10397-010-0626-8
 35. Rafique S, Decherney AH. Medical Management of Endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*. 2017;60(3):485-496. doi:10.1097/GRF.0000000000000292
 36. Dunselman GAJ, Vermeulen N, Becker C, et al. ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(3):400-412. doi:10.1093/humrep/det457
 37. Collinet P, Fritel X, Revel-Delhom C, et al. Management of endometriosis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2018;47(7):265-274. doi:10.1016/j.jogoh.2018.06.003
 38. Zorbas KA, Economopoulos KP, Vlahos NF. Continuous versus cyclic oral contraceptives for the treatment of endometriosis: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292(1):37-43. doi:10.1007/s00404-015-3641-1
 39. Abou-Setta AM, Houston B, Al-Inany HG, Farquhar C. Levonorgestrel-releasing intrauterine device (LNG-IUD) for symptomatic endometriosis following surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(1):CD005072. Published 2013 Jan 31. doi:10.1002/14651858.CD005072.pub3
 40. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(5):261-275. doi:10.1038/nrendo.2013.255
 41. Gheorghisan-Galateanu AA, Gheorghiu ML. Hormonal therapy in women of reproductive age with endometriosis: An update. *Acta Endocrinol (Buchar)*. 2019;15(2):276-281. doi:10.4183/aeb.2019.276

42. Vanhie A, Tomassetti C, Peeraer K, Meuleman C, Dhooghe T. Challenges in the development of novel therapeutic strategies for treatment of endometriosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20(5):593-600. doi:10.1517/14728222.2016.1118461
43. Platteeuw L, D'Hooghe T. Novel agents for the medical treatment of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014;26(4):243-252. doi:10.1097/GCO.0000000000000084
44. Koninckx PR, Craessaerts M, Timmerman D, Cornillie F, Kennedy S. Anti-TNF- α treatment for deep endometriosis-associated pain: A randomized placebo-controlled trial. *Hum Reprod*. 2008;23(9):2017-2023. doi:10.1093/humrep/den177
45. Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(2):CD004992. Published 2008 Apr 16. doi:10.1002/14651858.CD004992.pub3
46. Carmona F, Martínez-Zamora MA, Rabanal A, Martínez-Román S, Balasch J. Ovarian cystectomy versus laser vaporization in the treatment of ovarian endometriomas: a randomized clinical trial with a five-year follow-up. *Fertil Steril*. 2011;96(1):251-254. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.068
47. Han K, Seo SK, Kim MD, et al. Catheter-directed Sclerotherapy for Ovarian Endometrioma: Short-term Outcomes. *Radiology*. 2018;289(3):854-859. doi:10.1148/radiol.2018180606
48. Johnson NP, Hummelshoj L; World Endometriosis Society Montpellier Consortium. Consensus on current management of endometriosis. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1552-1568. doi:10.1093/humrep/det050
49. Koninckx PR, Timmermans B, Meuleman C, Penninckx F. Endometriosis: Complications of CO₂-laser endoscopic excision of deep endometriosis. *Hum Reprod*. 1996;11(10):2263-2268. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019087
50. Al Kadri H, Hassan S, Al-Fozan HM, Hajeer A. Hormone therapy for endometriosis and surgical menopause. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(1):CD005997. Published 2009 Jan 21. doi:10.1002/14651858.CD005997.pub2

51. Fedele L, Berlanda N. Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2004;9(1):167-177. doi:10.1517/eoed.9.1.167.32945
52. Becker CM, Gattrell WT, Gude K, Singh SS. Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: a systematic review. *Fertil Steril*. 2017;108(1):125-136. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.004
53. Koga K, Takamura M, Fujii T, Osuga Y. Prevention of the recurrence of symptom and lesions after conservative surgery for endometriosis. *Fertil Steril*. 2015;104(4):793-801. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.08.026
54. Donnez J, Pirard C, Smets M, Jadoul P, Squifflet J. Surgical management of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(2):329-348. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.03.004
55. Exacoustos C, Zupi E, Amadio A, et al. Recurrence of endometriomas after laparoscopic removal: Sonographic and clinical follow-up and indication for second surgery. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006;13(4):281-288. doi:10.1016/j.jmig.2006.03.002
56. Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update*. 2009;15(4):441-461. doi:10.1093/humupd/dmp007
57. Cheong Y, Tay P, Luk F, Gan HC, Li TC, Cooke I. Laparoscopic surgery for endometriosis: How often do we need to re-operate? *J Obstet Gynaecol*. 2008;28(1):82-85. doi:10.1080/01443610701811761
58. Weir E, Mustard C, Cohen M, Kung R. Endometriosis: What is the risk of hospital admission, readmission, and major surgical intervention? *J Minim Invasive Gynecol*. 2005;12(6):486-493. doi:10.1016/j.jmig.2005.09.001
59. Vercellini P, Somigliana E, Viganò P, De Matteis S, Barbara G, Fedele L. Post-operative endometriosis recurrence: a plea for prevention based on pathogenetic, epidemiological and clinical evidence. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(2):259-265. doi:10.1016/j.rbmo.2010.04.018
60. Ianieri MM, Mautone D, Ceccaroni M. Recurrence in Deep Infiltrating Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. *J Minim Invasive Gynecol*. 2018;25(5):786-793. doi:10.1016/j.jmig.2017.12.025
61. Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*. 1998;13(12):3496-3502. doi:10.1093/humrep/13.12.3496

62. Wieser F, Vigne JL, Ryan I, Hornung D, Djalali S, Taylor RN. Sulindac Suppresses Nuclear Factor- κ B Activation and RANTES Gene and Protein Expression in Endometrial Stromal Cells from Women with Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6441-6447. doi:10.1210/jc.2005-0972
63. Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis. *Reprod Sci.* 2015;22(9):1053-1059. doi:10.1177/1933719115592713
64. Fassbender A, Burney RO, O DF, D'Hooghe T, Giudice L. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:130854. doi:10.1155/2015/130854
65. Nisenblat V, Bossuyt PM, Shaikh R, et al. Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;2016(5):CD012179. Published 2016 May 1. doi:10.1002/14651858.CD012179
66. Liu E, Nisenblat V, Farquhar C, et al. Urinary biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2015(12):CD012019. Published 2015 Dec 23. doi:10.1002/14651858.CD012019
67. Gupta D, Hull ML, Fraser I, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;4(4):CD012165. Published 2016 Apr 20. doi:10.1002/14651858.CD012165
68. Abraham JE, Maranian MJ, Spiteri I, et al. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. *BMC Med Genomics.* 2012;5:19. Published 2012 May 30. doi:10.1186/1755-8794-5-19
69. Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology.* 2001;26(2):165-173. doi:10.1016/s0306-4530(00)00042-1
70. Gueye, NA., Stanhiser, J., Valentine, L., Kotlyar, A., Goodman, L., Falcone, T. (2017). Biomarkers for Endometriosis in Saliva, Urine, and Peritoneal

- Fluid. In: D'Hooghe, T. (eds) Biomarkers for Endometriosis. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59856-7_8
71. Bedaiwy MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta*. 2004;340(1-2):41-56. doi:10.1016/j.cccn.2003.10.021
 72. Kalu E, Sumar N, Giannopoulos T, et al. Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33(4):490-495. doi:10.1111/j.1447-0756.2007.00569.x
 73. Nisenblat V, Prentice L, Bossuyt PM, Farquhar C, Hull ML, Johnson N. Combination of the non-invasive tests for the diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;7(7):CD012281. Published 2016 Jul 13. doi:10.1002/14651858.CD012281
 74. Djokovic D, Calhaz-Jorge C. Angiogenesis as a therapeutic target in endometriosis. *Acta Med Port*. 2014;27(4):489-497. doi:10.20344/amp.5244
 75. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;955:89-406. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02769.x
 76. Edwards AK, Nakamura DS, Virani S, Wessels JM, Tayade C. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2013;97(1):85-94. doi:10.1016/j.jri.2012.10.012
 77. Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016;374(1):13-22. doi:10.1056/NEJMoa1414838
 78. Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, et al. Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1-to-Placental Growth Factor Ratio and Time to Delivery in Women With Suspected Preeclampsia. *Obstet & Gynecol*. 2016;128(2):261-269. doi:10.1097/AOG.0000000000001525
 79. Herraiz I, Llorba E, Verlohren S, Galindo A. Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/ PIGF Ratio in Singleton Pregnancies. *Fetal Diagn Ther*. 2018;43(2):81-89. doi:10.1159/000477903
 80. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, et al. Implementation of the sFlt-1/PIGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy:

- implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(3):241-246. doi:10.1002/uog.14799
81. Fasciani A. High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(1):50-54. doi:10.1093/molehr/6.1.50
 82. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1996;11(1):220-223. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019023
 83. Gagné D, Pagé M, Robitaille G, Hugo P, Gosselin D. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1674-1680. doi:10.1093/humrep/deg326
 84. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer.* 2008;8(12):942-956. doi:10.1038/nrc2524
 85. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M, Katano K, Suzumori K. Women with endometriosis have increased levels of placental growth factor in the peritoneal fluid compared with women with cystadenomas. *Hum Reprod.* 2003;18(12):2595-2598. doi:10.1093/humrep/deg491
 86. Zucchini C, de Sanctis P, Facchini C, et al. Performance of circulating placental growth factor as a screening marker for diagnosis of ovarian endometriosis: A pilot study. *Int J Fertil Steril.* 2016;9(4):483-489. doi:10.22074/ijfs.2015.4606
 87. Kim CH, Ahn JW, Kim SH, Chae HD, Kang BM. Effects on in vitro fertilization-embryo transfer outcomes of vascular endothelial growth factor receptor-1, -2 and -3 in eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(11):1631-1637. doi:10.1111/j.1447-0756.2011.01588.x
 88. Wikström AK, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Nordén-Lindeberg S, Olovsson M. Placental Growth Factor and Soluble FMS-Like Tyrosine Kinase-1 in Early-Onset and Late-Onset Preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2007;109(6):1368-1374. doi:10.1097/01.AOG.0000264552.85436.a1

89. Bourlev V, Iljasova N, Adamyan L, Larsson A, Olovsson M. Signs of reduced angiogenic activity after surgical removal of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.* 2010;94(1):52-57. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.02.019
90. Cho SH, Oh YJ, Nam A, et al. Evaluation of Serum and Urinary Angiogenic Factors in Patients with Endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(6):497-504. doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00535.x
91. Kim SH, Choi YM, Chae HD, Kim KR, Kim CH, Kang BM. Increased expression of endoglin in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;76(5):918-922. doi:10.1016/S0015-0282(01)02733-9
92. Vinayagam V, Bobby Z, Habeebullah S, Chaturvedula L, Bharadwaj SK. Maternal and Cord Blood Plasma sEng and TGF- β 1 in Patients with Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Pilot Study in a South Indian Population. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(3):QC32-QC34. doi:10.7860/JCDR/2017/22790.9600
93. Patel PG, Selvarajah S, Boursalie S, et al. Preparation of Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Cores for both RNA and DNA Extraction. *J Vis Exp.* 2016;(114):54299. Published 2016 Aug 21. doi:10.3791/54299
94. Laschke MW, Menger MD. Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. *Hum Reprod Update.* 2018;24(2):207-224. doi:10.1093/humupd/dmy001
95. Arruda MS, Petta CA, Abrão MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod.* 2003;18(4):756-759. doi:10.1093/humrep/deg136
96. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2698-2704. doi:10.1093/humrep/dei135
97. Busacca M, Marana R, Caruana P, et al. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(3 Pt 1):519-523. doi:10.1016/s0002-9378(99)70247-4
98. Samimi M, Pourhanifeh MH, Mehdizadehkashi A, Eftekhari T, Asemi Z. The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis in the

- pathophysiology of endometriosis: Basic science and new insights based on gene expression. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):19384-19392. doi:10.1002/jcp.28666
99. Groothuis PatrickG. Angiogenesis and Endometriosis. In: *Endometriosis*. Wiley-Blackwell; 2012:190-199. doi:10.1002/9781444398519.ch19
 100. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod.* 1998;13(6):1686-1690. doi:10.1093/humrep/13.6.1686
 101. Gupta D, Hull ML, Fraser I, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;4(4):CD012165. Published 2016 Apr 20. doi:10.1002/14651858.CD012165
 102. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction.* 2002;123(2):217-226. doi:10.1530/rep.0.1230217
 103. Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod.* 2007;22(8):2120-2127. doi:10.1093/humrep/dem149
 104. Cho S, Choi YS, Jeon YE, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptor-1 in endometriosis. *Microvasc Res.* 2012;83(2):237-242. doi:10.1016/j.mvr.2011.12.004
 105. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction.* 2006;132(3):501-509. doi:10.1530/rep.1.01110
 106. Levine RJ, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol.* 2005;48(2):372-386. doi:10.1097/01.grf.0000160313.82606.d7
 107. Wahid B, Rafique S, Ali A, et al. Biomarkers for diagnosis of pre-eclampsia and endometriosis. *Biomark Med.* 2018;12(10):1161-1173. doi:10.2217/bmm-2018-0058

108. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the Pathophysiological Implications and Clinical Role of Angiogenic Factors in Pregnancy. *Fetal Diagn Ther.* 2015;37(2):81-92. doi:10.1159/000368605
109. Chau K, Hennessy A, Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens.* 2017;31(12):782-786. doi:10.1038/jhh.2017.61
110. Xu L, Cochran DM, Tong RT, et al. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res.* 2006;66(8):3971-3977. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3085
111. Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, et al. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2010;25(2):398-405. doi:10.1093/humrep/dep419
112. Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, et al. Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related microRNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *PLoS One.* 2013;8(4):e62370. Published 2013 Apr 19. doi:10.1371/journal.pone.0062370
113. Ramón LA, Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, et al. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum Reprod.* 2011;26(5):1082-1090. doi:10.1093/humrep/der025
114. Artini PG, Ruggiero M, Monteleone P, et al. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in benign and malignant ovarian tumors. *Biomed Pharmacother.* 2008;62(6):373-377. doi:10.1016/j.biopha.2007.10.005
115. Vodolazkaia A, Yesilyurt BT, Kyama CM, et al. Vascular endothelial growth factor pathway in endometriosis: genetic variants and plasma biomarkers. *Fertil Steril.* 2016;105(4):988-996. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.12.016
116. Cho HY, Kyung MS. CYFRA 21-1 and Placental Growth Factor as Screening Markers for Endometriosis. *Med Sci Monit.* 2019;25:1087-1092. Published 2019 Feb 9. doi:10.12659/MSM.912787

117. Jose M Lopez-Novoa, Carmelo Bernabeu. ENG (endoglin). Accessed June 4, 2021. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ENGID40452ch9q34>
118. Garrido N, Navarro J, García-Velasco J, Remoh J, Pellice A, Simón C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update*. 2002;8(1):95-103. doi:10.1093/humupd/8.1.95
119. Fujishita A, Hasuo A, Khan KN, Masuzaki H, Nakashima H, Ishimaru T. Immunohistochemical Study of Angiogenic Factors in Endometrium and Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 1999;48(Suppl. 1):36-44. doi:10.1159/000052867
120. Hayrabyan S, Kyurkchiev S, Kehayov I. Endoglin (cd105) and S100A13 as markers of active angiogenesis in endometriosis. *Reprod Biol*. 2005;5(1):51-67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821778>
121. Harmsen MJ, Wong CFC, Mijatovic V, et al. Role of angiogenesis in adenomyosis-associated abnormal uterine bleeding and subfertility: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2019;25(5):647-671. doi:10.1093/humupd/dmz024
122. Chen X, Wang J, Tu F, Yang Q, Wang D, Zhu Q. Endoglin promotes cell migration and invasion in endometriosis by regulating EMT [published online ahead of print, 2021 Sep 20]. *Ginekol Pol*. 2021;10.5603/GP.a2021.0130. doi:10.5603/GP.a2021.0130
123. Savilova AM, Yushina MN, Rudimova YV, Khabas GN, Chuprynin VD, Sukhikh GT. Characteristics of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Human Endometrium and Endometriosis Lesions. *Bull Exp Biol Med*. 2016;161(4):610-615. doi:10.1007/s10517-016-3469-0
124. Ceccaroni M, Bounous VE, Clarizia R, Mautone D, Mabrouk M. Recurrent endometriosis: a battle against an unknown enemy. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2019;24(6):464-474. doi:10.1080/13625187.2019.1662391
125. Shen F, Liu X, Geng JG, Guo SW. Increased Immunoreactivity to SLIT/ROBO1 in Ovarian Endometriomas. *Am J Pathol*. 2009;175(2):479-488. doi:10.2353/ajpath.2009.090024

126. Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1823-1834. doi:10.1210/jcem.86.4.7418
127. Li T, Li YG, Pu DM. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression correlated with angiogenesis in human adenomyosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2006;62(4):229-235. doi:10.1159/000094426
128. Wang J, Deng X, Yang Y, Yang X, Kong B, Chao L. Expression of GRIM-19 in adenomyosis and its possible role in pathogenesis. *Fertil Steril.* 2016;105(4):1093-1101. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.12.019
129. Amini P, Ettlin J, Opitz L, Clementi E, Malbon A, Markkanen E. An optimized protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissue amenable for next-generation sequencing. *BMC Mol Biol.* 2017;18(1):22. Published 2017 Aug 23. doi:10.1186/s12867-017-0099-7

