

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA DE MÉDICO CIRUJANO  
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



**CITOMETRÍA DE FLUJO DEL INMUNOFENOTIPO DE MACRÓFAGOS  
PERITONEALES DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS: REVISIÓN SISTEMÁTICA  
DE LA LITERATURA**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO  
PRESENTA:

M.P. ANGELA BECERRIL DELGADO

DIRECTORES DE TESINA:

Dr. En H. ARTURO GARCIA RILLO

Dra. En. I.M. BEATRIZ ELINA MARTINEZ CARRILLO

REVISORES DE TESINA

PH. D. MARIO ENRIQUE ARCEO GUZMAN

M. EN I.C. HÉCTOR OCAÑA SERVÍN

TOLUCA, MÉXICO, MARZO 2013

## ÍNDICE

	pág.
Antecedentes	2
Planteamiento del problema	15
Justificaciones	17
Objetivos	18
Método	19
Análisis de citometría de flujo en identificación de poblaciones celulares	26
Inmunología de la endometriosis	35
Macrófagos involucrados en la patogenia de la endometriosis	52
Proporción de macrófagos asociados al diagnóstico de endometriosis	59
Grado de expresión de los marcadores en macrófagos que se asocian al diagnóstico de endometriosis	60
Conclusiones	61
Bibliografía	64
Anexo I: Información relevante de los artículos incluidos en el estudio	71

## ANTECEDENTES

En 1860 Rokitanski describió el síndrome de endometriosis<sup>1</sup>, el cual se considera como un padecimiento de compleja etiopatogenia debido a la gran cantidad de factores fisiológicos que pueden modificar su evolución y el comportamiento del tejido endometriósico. La endometriosis, es una patología benigna, estrógeno dependiente y caracterizada por la presencia de tejido glandular y estroma endometrial en sitios ectópicos<sup>2</sup>, este hallazgo es característico y diagnóstico por laparoscopia<sup>3</sup> o laparotomía.

Se ha reportado que el riesgo para sufrir endometriosis es hasta 8 veces mayor en mujeres con madres o hermanas afectadas que en los grupos control, lo que sugiere que la historia familiar de la enfermedad es un factor importante para consignar y en su caso explorar para el establecimiento del diagnóstico. No obstante, el patrón con el cual se transmite no ha sido aún dilucidado. La endometriosis tiende a presentarse de manera precoz en pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad, y tienden a desarrollar un curso agresivo. En cuanto a la causa o factores etiológicos, Jameson ha mostrado que puede existir una deficiencia inmunológica heredada, y ser el origen de este trastorno.<sup>4</sup>

Debido a la complejidad para realizar el diagnóstico de endometriosis, la incidencia es incierta y subdiagnosticada, se reporta una incidencia del 6-10% de la población de mujeres en edad reproductiva, con manifestaciones clínicas como dismenorrea, dispareunia, dolor pélvico crónico e infertilidad, esta última con una prevalencia de 20%<sup>5</sup>.

La endometriosis es un padecimiento cuyo diagnóstico de certeza solo puede realizarse mediante la observación directa de las lesiones de manera intencionada por laparoscopia o como hallazgo transquirúrgico, debido a esto, se estima que las estadísticas reportadas tienen un sesgo importante, lo cual dificulta el conocer la incidencia de dicho padecimiento. En un estudio realizado por Velebil y colaboradores, se determinó que una de las causas más frecuentes de padecimientos ginecológicos en mujeres estadounidenses en edad reproductiva es la endometriosis<sup>2</sup>. Otro estudio de cohorte efectuado en estados unidos entre

1988 y 1990 con más de 5 000 000 de casos, se encontró que en 11.2% de ellos el diagnóstico primario fue endometriosis. Otro estudio previo (1980) reportó que 6.9% de las hospitalizaciones por problemas genitourinarios fueron por causa de la endometriosis<sup>3</sup>. Ayala y colaboradores (2007) mencionan que; Si la prevalencia de casos estimada para estados unidos es de 14 682 770, una extrapolación arbitraria para México sería una prevalencia de 5,247,979 de casos con base en una población de 104 millones de habitantes<sup>1</sup>. En términos generales que este padecimiento afecta del 5 al 35% de mujeres en edad reproductiva y se podría asociar hasta en el 50% de los casos de pacientes con diagnóstico de infertilidad y dolor crónico<sup>5</sup>. La variabilidad de estos datos pone de manifiesto la necesidad de establecer algún otro método diagnóstico y de evaluar la fisiopatología de esta afección buscando encontrar nuevas opciones de tratamiento.

#### *Diagnóstico de endometriosis*

Para realizar el diagnóstico, es necesario observar las lesiones endometriósicas, por ello la laparoscopia es considerada como el “estándar de oro”<sup>4, 6, 7, 8</sup>; la histopatología establece el diagnóstico definitivo aunque en varias situaciones existen lesiones retroperitoneales no detectadas durante la cirugía<sup>9</sup>. Analizando las biopsias de lesiones características, obtenidas por endoscopia, en sitios anatómicos de alta frecuencia, se encontró que las lesiones negras y rojas tenían un diagnóstico positivo para endometriosis superior al 90%, las sospechosas (blancas) solo un 31%; de un total de 138 pacientes solo en 84.1% sometidos a cirugía fue posible diagnosticar la enfermedad posterior al análisis por histopatología. Debe tomarse en cuenta que el diagnóstico a través de cirugía laparoscópica depende de varios factores como: la calidad del equipo utilizado y la habilidad y experiencia del cirujano, por ende se puede tener 11% de los casos sin una lesión detectable independiente de la sintomatología<sup>10</sup>.

Los síntomas más frecuentes que se asocian con la presencia de endometriosis son: dismenorrea, disuria, dispareunia, dolor pélvico crónico, síntomas perimenstruales, intestinales, datos de irritación peritoneal e infertilidad<sup>11</sup>.

Los síntomas observados en pacientes con endometriosis han sido descritas en su mayoría por estudios europeos, norteamericanos y asiáticos, coincidiendo en colocar a la dismenorrea como el síntoma más frecuente, seguido de dispaurenia e infertilidad<sup>4,12</sup>. La hipersensibilidad pélvica, la situación anatómica del útero, ligamentos útero-sacos hipersensibles o crecimiento ovárico son sugestivos de endometriosis pero insuficientes para el diagnóstico, hay mayor certidumbre ante la presencia de nódulos infiltrantes profundos, palpables en los ligamentos útero-sacos o en el saco de Douglas; dicho hallazgo cobra mayor relevancia si la evaluación pélvica se realiza durante la menstruación<sup>13</sup>. En un estudio realizado en Reino Unido, los síntomas de dolor abdominal y pélvico, dismenorrea, menorragia y dispaurenia, fueron asociados con la presencia de endometriosis, demostrando que 83% de las mujeres con este padecimiento presentaban sintomatología<sup>14</sup>. Un gran problema es la inespecificidad de la sintomatología y su presencia en otras entidades clínicas como son la enfermedad pélvica inflamatoria y el síndrome de colon irritable, se considera que una mujer con endometriosis tiene 3.5 veces mayor posibilidad de ser diagnosticada con síndrome de colon irritable y 6.4 veces de tener enfermedad pélvica inflamatoria en comparación con mujeres sanas<sup>15</sup>.

La endometriosis es una enfermedad heterogénea con una morfología típica y atípica que abarca un amplio espectro, desde un implante único peritoneal de 1 mm hasta endometriomas de 10 cm con obliteración del fondo de saco de Douglas. Consecuentemente, un buen estadiaje clínico es necesario para informar verazmente en relación al pronóstico y al tratamiento<sup>16</sup>.

La Sociedad Americana para la Medicina Reproductiva revisó el sistema para la clasificación de la endometriosis (ASRM 1996) y actualmente es el estadiaje más ampliamente admitido<sup>17,18</sup>. Esta clasificación reconoce cuatro estadios con sus respectivos puntajes, a saber:

Peritoneo		Endometriosis	< 1 cm.	1-3 cm.	> 3 cm.
		superficial	1	2	4
		profunda	2	4	6
Ovario	Dcho.	superficial	1	2	4
		profunda	4	16	20
	Izdo.	superficial	1	2	4
		profunda	4	16	20
Fond de saco posterior Douglas		Parcial	4	Completa 40	
		Adherencias	<1/3 incluido	1/3-2/3 incluido	>2/3 incluido
Ovario	Dcho.	débiles	1	2	4
		firmes	4	8	16
	Izdo.	débiles	1	2	4
		firmes	4	8	16
Trompas	Dcho.	débiles	1	2	4
		firmes	4	8	16
	Izdo.	débiles	1	2	4
		firmes	4	8	16

Clasificación de Endometriosis (American Society for Reproductive)

Estadio I (mínimo) = 1-5 puntos

Estadio II (leve) = 6-15 puntos

Estadio III (moderado) = 16-40 puntos

Estadio IV (severo) = > 40 puntos

Desafortunadamente, el sistema de clasificación no se correlaciona bien con la clínica. Esta pobre capacidad predictiva está relacionada con la asignación de la puntuación elegida para la patología observada y los arbitrarios puntos de corte escogidos para establecer el estadio de la enfermedad <sup>19</sup>.

Desde el punto de vista histológico las lesiones de la endometriosis pueden presentarse de múltiples formas, aunque se han descrito algunos patrones básicos. En general la implantación del tejido endometrial ectópico comienza por el desarrollo de quistes microscópicos (endometriosis microscópica) que según su localización pueden ser intramesoteliales o submesoteliales. A medida que el proceso de proliferación continúa y debido a la acción de las hormonas liberadas con cada ciclo menstrual, aumenta la vascularización del tejido aberrante, la

actividad de las glándulas endometriales y la descamación del mismo, lo que incrementa el tamaño del quiste. De esta manera se originan las denominadas lesiones tempranas, que pueden corresponder a estructuras papulares o vesiculares con una apariencia rojiza característica al examen laparoscópico. Las pápulas y vesículas siguen creciendo y cada vez se acumula más material hemorrágico en el interior del quiste y las paredes del mismo se adelgazan en forma progresiva; además, el estudio histológico evidencia la presencia de un proceso de fibrosis y reacción inflamatoria. A medida que pasa el tiempo los focos endometriósicos cambian de color, tornándose violáceos (lesiones negro-azuladas), constituyendo la endometriosis avanzada. A medida que aumenta la fibrosis, disminuye la respuesta del tejido ectópico a los estímulos hormonales, pero no desaparece por completo; los cambios inflamatorios y fibróticos se hacen más prominentes y terminan por conducir al desarrollo de áreas blanquecinas, constituidas por tejido fibroso en su mayor parte, carentes de estroma y con un mínimo contenido de glándulas endometriales inactivas; estos cambios corresponden a la denominada endometriosis cicatricial.

Además de los cambios anatómicos que se suceden como consecuencia del proceso inflamatorio mismo, en respuesta a la actividad cíclica del endometrio ectópico, han surgido otra serie de teorías que pretenden explicar los aspectos fisiopatológicos de la infertilidad secundaria a endometriosis y sin embargo, no se ha demostrado que alguno de ellos por si solo disminuya la fecundidad <sup>17</sup>.

### *Etiopatogenia*

Para explicar la etiología de la endometriosis se han desarrollado varias teorías, estas son:

1.- *Teoría de la menstruación retrógrada* (Sampson.1927), basada en la observación del reflujo menstrual y la implantación de células de endometrio viables en sitios ectópicos<sup>5,8,9,10</sup>. En los sitios ectópicos de implantación, las células son capaces de proliferar bajo el estímulo hormonal. Se ha reportado la presencia de restos de componentes menstruales en un alto porcentaje en el

peritoneo de las mujeres estudiadas, por lo que se presume que el reflujo menstrual es un suceso frecuente. Así mismo, mediante el empleo de modelos animales o cultivo celular *in vitro*, se ha demostrado que la viabilidad de las células endometriales obtenidas de la cavidad peritoneal es mayor a 50% y que estas son capaces de implantarse, proliferar y responder a hormonas esteroideas, aunado al hecho de una menor capacidad de las células locales para limitar el desarrollo de las células implantadas, este escenario biológico es favorable para la progresión de la implantación endometrial ectópica. Sin embargo hay pocos estudios que analicen las etapas tempranas en la cavidad peritoneal que permiten la adhesión y anclaje de las células endometriales al epitelio peritoneal <sup>1,6, 20</sup>. Se ha propuesto que la propia distribución anatómica favorece la implantación del tejido endometrial ectópico, se ha reportado que el primer sitio de afectación son los ovarios (54.9%), seguido por el ligamento ancho (35.2%). La posición del útero también es crucial, ya que se encuentra en anteversoflexión, encontrando una mayor incidencia de presentación de implantes en la zona anterior a la situación anatómica en la que se encuentre el útero. Así mismo, las malformaciones Müllerianas facilitan el reflujo, se ha reportado la relación incrementada entre la incidencia de alteraciones morfológicas con la endometriosis que ponen de manifiesto la importancia de la obstrucción de las salpinges<sup>1</sup>.

2.- *Teoría de la Metaplasia Celómica* (Meyer R, et al 1919), basada en el epitelio celómico como el origen común de células endometriales y peritoneales, se piensa que algún estímulo, aún no identificado, puede generar metaplasia, sin embargo, en los pacientes que aumenta la metaplasia también aumentaría la frecuencia de presentación de la enfermedad, lo cual no siempre sucede <sup>1,11</sup>. Entonces la endometriosis es resultado de la metaplasia de células, dependiente de estímulos hormonales y/o infecciosos <sup>1</sup>.

3.- *Teoría de los residuos embrionarios*, (Von Recklinghausen 1890) sugiere que la endometriosis tiene su origen Mülleriano, en los conductos de Wolff y Russel del tejido paramesonéfrico, que pueden ser activados para diferenciarse en tejido endometrial cuando existe un estímulo aún no determinado <sup>1,12</sup>.



4.- *Teoría de diseminación por vía linfática y vascular*, plantea la diseminación de la endometriosis por estas vías<sup>13</sup>. La cual explicaría la aparición de focos endometriósicos en otros órganos como pulmón y en este grupo se incluyen las causas iatrogénicas: como la aparición de focos endometriósicos posterior a evento quirúrgico, o posterior a cesárea en la zona de la cicatriz <sup>2</sup>.

5.- *Teoría de la inducción* (Levander y Normann). Plantea que algún factor bioquímico o inmunológico puede inducir que las células indiferenciadas adquieran características propias del tejido endometrial. Estudios experimentales mostraron que cuando se implantaron secciones de pared uterina de conejas embarazadas al tejido subcutáneo de conejas con solo dos meses de edad se observó la formación de endometrio y quistes en el tejido circunvecino, sin embargo, también se ha reportado la ausencia de diferenciación a estroma endometrial incluso con la administración de altas dosis de estrógeno, lo que sugiere que en algunos casos de endometriosis el factor inductor de diferenciación no son los estrógenos <sup>1</sup>.

Ninguna de las teorías mencionadas logra explicar todos los aspectos fisiopatológicos y clínicos de la endometriosis <sup>20</sup>. Sin embargo, la teoría de Sampson es la más aceptada, razón por la que gran parte de la investigación actual en endometriosis se basa en esta línea de trabajo. Con base en esta teoría se han determinado cinco pasos decisivos para el desarrollo de la endometriosis: a) Adhesión de la célula endometrial a la superficie peritoneal; b) Invasión de estas células al mesotelio; c) Reclutamiento de células inflamatorias; d) Angiogénesis; e) Proliferación celular endometrial, que es dependiente de factores hormonales, ambientales, de mensajeros celulares, moléculas de adhesión y citocinas <sup>1</sup>.

#### *Factores que influyen en la progresión de la endometriosis*

1. Distorsión de la anatomía pélvica. Las adherencias pélvicas, incluidas aquellas que se producen con la endometriosis, pueden entorpecer la liberación del ovocito desde el ovario, su captación o el transporte de ovocito.

2. Estimulación Parácrina y endocrina alterada en peritoneo. El fluido peritoneal de mujeres con endometriosis, contiene un inhibidor de la captura ovocitaria que

impide la interacción con la fimbria <sup>21</sup>. Esas alteraciones tienen múltiples efectos adversos sobre la función del ovocito, espermatozoides, embrión y específicamente sobre las trompas de Falopio lo que podría favorecer el flujo de endometrio al sitio ectópico que ocupa en la endometriosis<sup>22</sup>. Así mismo, la presencia de tejido endometrial favorece la activación de los macrófagos, como consecuencia del proceso inflamatorio, y lleva a la producción y liberación de tromboxano A2 y otros factores mediadores de la inflamación que interfieren con la ovulación, formación del cuerpo lúteo y con la motilidad de los espermatozoides. Las prostaglandinas han sido también implicadas en la génesis de la infertilidad de pacientes con endometriosis. Estos compuestos son producidos en grandes cantidades a nivel del tejido endometrial y en los focos ectópicos al parecer como consecuencia del proceso inflamatorio. Por ejemplo, la prostaglandina F2 incrementa el tono y la amplitud de la musculatura uterina generando dismenorrea. Teóricamente, alteraciones con los niveles de prostaglandinas en pacientes con endometriosis podrían ocasionar problemas en la implantación o placentación. Además, la fase folicular en pacientes con endometriosis es más corta que en mujeres sanas, con niveles de estradiol que pueden estar bajos, y de progesterona dentro de lo normal. Hay marcada tendencia a la maduración de un mayor número de folículos, por norma más pequeños al momento del pico de hormona luteinizante. Puede también presentarse en pacientes con enfermedad avanzada, la no ruptura del folículo de De Graaf, que lleva también a infertilidad. Las linfocinas son mensajeros intracelulares que han sido implicadas en la génesis de este trastorno en la endometriosis. Es así como la Interleucina-1 (IL-1) mediador de la respuesta inflamatoria ha demostrado ser deletérea para el crecimiento embrionario en fase temprana.

3. Alteraciones de la función hormonal y mediación celular. En el endometrio de algunas mujeres con endometriosis puede detectarse una elevada concentración de anticuerpos IgG e IgA así como de linfocitos, adicionalmente, se ha observado el incremento de auto-anticuerpos frente a antígenos endometriales en algunas

mujeres con endometriosis. Es probable que estos anticuerpos cumplan un papel deletéreo en el desarrollo de la endometriosis.

4. Alteraciones endocrinas y ovulatorias. Se ha propuesto que pacientes con endometriosis pueden tener alteraciones endocrinas y ovulatorias, que incluyen el síndrome del folículo luteinizado no roto, defectos de fase lútea, alteraciones en el crecimiento folicular o crecimiento folicular prematuro, así como incremento en la concentración de la hormona luteinizante. Aunque esta hipótesis ha sido propuesta, no existe evidencia que la apoye o la descarte.

5. Disminución de la implantación. Las alteraciones de la función endometrial pueden contribuir a la disminución de la fecundidad observada en pacientes con endometriosis. Existe en alguna paciente con endometriosis una expresión endometrial reducida de  $\alpha$  y  $\beta$  integrinas (moléculas celulares de adhesión) durante el momento de la implantación. Muy recientemente se han observado, en pacientes estériles con endometriosis, niveles muy bajos de una enzima implicada en la síntesis de un ligando endometrial (que cubre el trofoblasto sobre la superficie del blastocisto). Estos datos aumentan la hipótesis de que alteraciones funcionales del endometrio pueden predisponer conjuntamente al desarrollo de la endometriosis, así como a la disminución de los mecanismos de implantación en pacientes afectadas por endometriosis <sup>23</sup>.

### *El sistema inmunológico y el desarrollo de endometriosis*

Recientemente los aspectos inmunológicos que participan en la endometriosis han adquirido particular interés, dado que tanto en mujeres sanas como en las que padecen endometriosis han sido aisladas células endometriales viables durante la menstruación se sugiere que los mecanismos de vigilancia inmunológica, que eliminan células que desarrollan metaplasia o se encuentran en situación ectópica, fallan por ausencia o estar disminuidos <sup>1,16, 24</sup>.

La presencia de células que participan en la respuesta inmunitaria han sido cuantificadas y estudiadas en pacientes con endometriosis, por ejemplo, la acumulación de macrófagos en lesiones endometriósicas podría ser la causa de la

persistencia crónica de inflamación, a través de secretar factores mitogénicos y angiogénicos<sup>24</sup>, además, se ha detectado un aumento de la presencia de linfocitos NK y de su función citotóxica contra células endometriales<sup>25,26, 27,28</sup>.

La cantidad de factores quimiotácticos incrementados en pacientes con endometriosis son clave para mantener el proceso inflamatorio, particularmente RANTES que actúan sobre monocitos, células NK, células T y eosinófilos. Los macrófagos activados en pacientes con endometriosis, secretan IL-1 $\alpha$ , un fuerte inductor para la expresión genética de RANTES<sup>29,30,31</sup>, quimiocina que a su vez recluta células que liberan factores inflamatorios, promoviendo de esta manera la endometriosis<sup>32</sup>. Además se ha encontrado asociación entre la presencia de macrófagos peritoneales y el dolor en pacientes con endometriosis, lo cual se puede explicar por la reparación y desarrollo de fibras neurales a nivel peritoneal, derivado de la remodelación anatómica que se observa en pacientes con endometriosis<sup>7,32</sup>.

La endometriosis se desarrolla principalmente en la cavidad pélvica por lo cual el líquido peritoneal adquiere importancia por los factores que contiene. Este líquido, contiene exudado ovárico secundario al incremento en la permeabilidad vascular, particularmente durante la fase folicular estrógeno dependiente<sup>24,25</sup>, por lo que la concentración de estrógenos y progesterona que regulan el ciclo menstrual se expresan en mayor concentración en el líquido peritoneal de forma cíclica. Además se ha reportado que la globulina fijadora de esteroides sexuales, también presente en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, alcanza hasta un 67% de su nivel intravascular<sup>25</sup>.

Poco se ha estudiado la circulación de células en el líquido peritoneal, su compartimentalización y mecanismos de regulación en términos de volumen y diferenciación celular en endometriosis. Específicamente, la concentración incrementada de macrófagos y factores quimiotácticos derivadas de estas células podrían afectar la diferenciación o funcionalidad de poblaciones linfocitarias<sup>26,27</sup>. Se ha reportado que en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis puede detectarse un incremento en la concentración del Factor Transformador de

Crecimiento (TGF- $\alpha$ ) y del Factor de Crecimiento Vasculo-Endotelial (VEGF), además de otras citocinas como: Factor de Necrosis Tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-8 (IL-8), IL-10, IL-6, IL-13, Interferón- $\beta$  y el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (M-CSF) <sup>24,33</sup>. En condiciones fisiológicas, los macrófagos circulantes se encargan del reconocimiento y procesamiento de determinantes antigénicos, que serán luego presentados a linfocitos T, los cuales mediante la producción de las interleucinas inducen la expansión clonal de estas líneas celulares. De modo paralelo, los linfocitos B bajo el estímulo antigénico y de las interleucinas, se encargan de la producción de anticuerpos.

Se ha reportado que en fases iniciales de la endometriosis el sistema inmunológico desarrolla una respuesta con base en el reconocimiento antigénico del tejido ectópico, el cual genera una respuesta de monocitos, macrófagos y células NKs, estas células sintetizan y liberan al medio altos niveles de IL-1, IL-2, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa, interferón, C3 y C4. Sin embargo, también se ha detectado la disminución en el reconocimiento y en la intensidad de la respuesta inmune contra los antígenos endometriales autólogos, en pacientes con endometriosis. Estos estudios indican que los monocitos podrían cumplir un papel regulador importante para el desarrollo de la endometriosis.

Mediante el cocultivo de macrófagos y células endometriales, de pacientes sanas y con endometriosis, se observaron diferencias significativas entre unas y otras ya que los macrófagos de peritoneo y los monocitos circulantes suprimen la proliferación del tejido endometrial *in vivo* e *in vitro*. No obstante, los monocitos de pacientes con endometriosis, estimulan el crecimiento del endometrio *in vivo*, a diferencia de lo que se observa en controles sanos. Además, algunos estudios muestran el papel modulador del sistema monocito-macrófago sobre la acción de las células asesinas naturales, lo que indica que las actividades de monocitos afectan la capacidad de respuesta de otras células las que a su vez podrían ser la causa de la cronicidad de la endometriosis. Se ha reportado una disminución de la función citotóxica de células naturales asesinas cuando se cultivan con fluido peritoneal de pacientes con endometriosis<sup>6,9</sup>. Más aun, se ha reportado

alteraciones de tipo funcional a nivel de la inmunidad humoral y celular en muestras de pacientes con endometriosis, con aumento en el número de linfocitos T cooperadores respecto de los supresores, tanto a nivel periférico como de la cavidad peritoneal, que se traduce en aumento de los auto anticuerpos y otras alteraciones de la inmunidad humoral. Por ejemplo, ya que la proporción de linfocitos cooperadores puede aumentar en sangre periférica y en la cavidad peritoneal, este cambio podría generar defecto de la inmunidad celular con la desviación de la respuesta a un patrón Th2 y una exagerada síntesis de anticuerpos. Así mismo, se ha documentado reducción de la proliferación clonal de células B timo dependientes en respuesta a antígenos endometriales meteorólogos. Además, se ha observado una disminución de la respuesta linfocitaria y actividad citotóxica en respuesta a la inoculación de antígenos endometriales autólogos, como consecuencia probablemente de una disminución en la capacidad de reconocimiento antigénico.

Según su actividad existen dos subclases de macrófagos: Los M1 que son potentes células efectoras que destruyen microorganismos y células tumorales al producir grandes cantidades de citocinas y los M2 que controlan la reacción inflamatoria, promueven angiogénesis y modulan la inmunidad de células T cooperadoras. Un desequilibrio entre estas dos subclases facilitaría la evolución de la endometriosis peritoneal. Hasta el momento se desconoce si en tejido endometrial ectópico son los macrófagos M1 o los M2 los responsables de perpetuar el estado de inflamación. Sin embargo se sabe que los macrófagos facilitan la evolución de la endometriosis por aumento en la liberación de factores y citocinas promotoras del crecimiento en combinación con una actividad fagocítica afectada. Los macrófagos peritoneales expresan receptores limpiadores clase A o “scavengers” en estado fisiológico, al examinar los macrófagos de pacientes con endometriosis se encontró que expresan bajas concentraciones de estos receptores *in situ* pero su adherencia se incrementa *in vitro* luego de una regulación postranscripcional, lo que explicaría la ausencia de interacción con la matriz extracelular. Lo que sugiere que la presencia de macrófagos en tejido endometrial ectópico no es un evento futil y que podrían ser entonces un blanco

celular a través del cual se podría regular el desarrollo de la endometriosis. Con base en estudios recientes se detectó la presencia de receptores estrogénicos en macrófagos que responden a estos esteroides y se estima que podrían modular la función inmunitaria de estas células, incluso se ha determinado la existencia de receptores de progesterona y su relación con el factor de crecimiento de hepatocitos que se elevan con estrógenos y disminuye con progesterona, por lo que este factor de crecimiento se reduce cuando se tratan con tamoxifeno <sup>10</sup>.

#### *Perspectivas de investigación sobre endometriosis*

Es necesario desarrollar modelos *in vitro* adecuados que ayuden a explicar las observaciones *in vivo*.

Los modelos experimentales deben expresar condiciones permisivas para el análisis de la inflamación crónica, con secreción aumentada de citocinas proinflamatorias, desarrollo de neoangiogénesis, reflujo endometrial y función autoinmunitaria deteriorada.

Un microambiente peritoneal anormal con aumento de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1, IL-6 e IL-8) podría favorecer la implantación y el crecimiento de tejido endometrial “regurgitado”<sup>19</sup>.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La endometriosis se clasifica atendiendo a distintos criterios. La clasificación más usada es la de la sociedad Americana de Fertilidad, (ASRM), revisada en 1997 que establece 4 estadios: mínimo, leve, moderado y severo, según tamaño y localización de las lesiones y la presencia y características de las adherencias, pero no incluye ningún análisis celular de las lesiones. Esta clasificación es muy cuestionada, ya que no tiene en cuenta ni la morfología ni la actividad biológica de los implantes, hecho más importante que la localización o extensión de la enfermedad, sobre todo con vistas al pronóstico y tratamiento. Ya que hay endometriosis con focos mínimos de gran actividad y gran repercusión clínica, mientras que estadios avanzados pueden ser silentes desde el punto de vista clínico.

La sintomatología inespecífica observada en los pacientes con endometriosis dificulta el diagnóstico y tratamiento oportuno de los mismos. Los factores de riesgo asociados a endometriosis como IMC, paridad, tabaquismo, consumo de alcohol, edad de menarca, duración del periodo de lactancia e historia familiar asociada con endometriosis son factores no siempre presentes lo cual dificulta un análisis que permita asociar tales factores con el mecanismo o participación de cada uno de ellos en la génesis de esta patología. Como ejemplo, se considera que el dolor en la endometriosis tiene su origen en el proceso inflamatorio, presión, presencia de adherencias y generación de prostaglandinas por los implantes de endometrio <sup>1</sup>, sin embargo hay pacientes que no presentan respuestas inflamatorias extensas o el número y extensión de las adherencias es mínimo o se han detectado prostaglandinas en poca cantidad por lo cual no parece existir una relación directamente proporcional entre el grado de dolor con los supuestos factores desencadenantes <sup>2</sup>. También se ha investigado la expresión de receptores para el dolor en tejido endometrial <sup>3</sup>, aunque hasta el momento no se ha encontrado una asociación directa entre el grado de expresión de los receptores con el dolor referido por la pacientes.



La inflamación presente en peritoneo de pacientes con endometriosis parece estar asociada con el dolor <sup>6</sup>, de todas las células que componen el infiltrado inflamatorio en el peritoneo de mujeres con endometriosis los macrófagos son candidatos celulares que podrían ser decisivos para iniciar el establecimiento definitivo de las lesiones endometriósicas, además de su mantenimiento y generadores del daño al tejido que sea a su vez la causa del dolor, esto es debido a la secreción de TNF- $\alpha$ , VEGM y PGE2 que perpetuaría la presencia del tejido ectópico en peritoneo (7). Hasta el momento no hay estudios en los cuales se haya explorado de manera completa o suficiente la asociación existente entre la presencia de macrófagos y la intensidad de la sintomatología en endometriosis.

La presente revisión pretende analizar la literatura correspondiente al mecanismo fisiopatológico de la endometriosis en el cual están participando macrófagos con un inmunofenotipo característico (células peritoneales CD14<sup>+</sup>TREM-1<sup>+</sup>mieloperoxidasa<sup>+</sup>TNF-alfa<sup>+</sup>) y su probable asociación con la clínica de la enfermedad, así como los usos de la citometría de flujo para relacionar la proporción y el grado de expresión de estos macrófagos en la patogenia de la endometriosis.

Considerando lo anterior, surgen las siguientes preguntas de investigación:  
¿Existe evidencia científica en la literatura en relación a la utilidad de la citometría de flujo en la detección de los inmunofenotipos de macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis?

¿Existe evidencia objetiva en la literatura para relacionar la proporción de macrófagos con inmunofenotipo específico por citometría de flujo para que se asocie al diagnóstico de endometriosis?

¿Existe evidencia objetiva en la literatura que relacione el grado de expresión de los marcadores en macrófagos con inmunofenotipo específico por citometría de flujo que se asocie al diagnóstico de endometriosis?

## JUSTIFICACIÓN

La importancia de este trabajo recaerá en la revisión de la literatura acerca de la participación de los macrófagos en la patogénesis de la endometriosis y el uso de la citometría de flujo como instrumento de análisis tanto de su proporción como del grado de expresión para la patogenia de la enfermedad.

El estudio de los factores que permiten el desarrollo de células endometriales en peritoneo no está completo, los macrófagos secretan una gama de citocinas que promueven estos procesos. La participación y fisiopatología de los macrófagos en la endometriosis podría explicar los mecanismos mediante los cuales se establece y perpetúa esta enfermedad. El conocimiento de los inmunofenotipos de células CD14 positivas podría ayudar establecer diagnósticos tempranos con base en la presencia de células con cierto inmunofenotipo (células peritoneales CD14<sup>+</sup>TREM-1<sup>+</sup>mieloperoxidasa<sup>+</sup>TNF-alfa<sup>+</sup>). El diagnóstico temprano del proceso endometriósico podría; a) limitar la progresión de la patología al prevenir la formación de nuevos focos ectópicos y controlar de manera más efectiva los síntomas más severos relacionados con la endometriosis, además de b) ayudar a disminuir la incidencia de cirugías invasivas cuyo propósito es la eliminación de focos ectópicos y c) disminuir los costos del tratamiento y limitar los daños colaterales derivados de la progresión de la enfermedad o por la terapéutica empleada.

## OBJETIVOS

### **General:**

Realizar una revisión sistemática de la literatura existente, que relacionen la presencia y actividad de macrófagos peritoneales con inmunofenotipo definidos por citometría de flujo, con su participación en el cuadro clínico o su posible aplicación como instrumento diagnóstico.

### **Específicos:**

- Determinar si existe evidencia objetiva en la literatura para relacionar la proporción de macrófagos con inmunofenotipo específico por citometría de flujo que se asocie al diagnóstico de endometriosis.
- Determinar si existe evidencia objetiva en la literatura para relacionar el grado de expresión de los marcadores en macrófagos con inmunofenotipo específico por citometría de flujo que se asocie al diagnóstico de endometriosis.

## MÉTODO

a) *Identificación de la literatura.* Se realizó una búsqueda intencionada de artículos encontrados en la base de datos PubMed, con el siguiente algoritmo de búsqueda:

1. Endometriosis
2. 1# AND macrophages
3. 1# AND 2# AND peritoneal
4. 1# AND 2# AND 3# AND flow cytometry
5. 1# AND 2# AND 3# AND 4# AND inmunofenotype

Con el algoritmo mencionado se obtuvo el siguiente detalle de búsqueda:

("endometriosis"[MeSH Major Topic] AND "macrophages"[MeSH Terms]) AND ("peritoneum"[MeSH Terms] OR "peritoneum"[All Fields] OR "peritoneal"[All Fields] OR " flow cytometry "[All Fields] OR " inmunofenotype "[All Fields])

b) *Selección de los estudios.* Además de la búsqueda realizada en la base de datos PubMed, se llevó a cabo la búsqueda en las siguientes bases bibliográficas:

- Access medicine
- Embase
- Redalyc
- Scopus
- Springer Biochemistry
- Ovid

Los artículos fueron seleccionados mediante los criterios indicados en las “Guías para el usuario de la literatura médica” elaboradas por el Evidence Based Medicine Working Group (Guyatt GH, Sackett DL, Cook DJ. JAMA 1993; 270:2598), en las que a través de una serie de preguntas directas con las que se comprobó si la revisión cumple con los criterios de calidad exigidos:

1.- ¿Son válidos los resultados del estudio?

*Criterios primarios:*

¿Abordó la revisión de conjunto un problema clínico focalizado?

¿Fueron apropiados los criterios para la inclusión de los artículos a seleccionar?

*Criterios secundarios:*

¿Es poco probable que se pasaran por alto estudios relevantes importantes?

¿Se evaluó la validez de los estudios incluidos?

¿Fueron reproducibles las evaluaciones de los estudios?

¿Fueron similares los resultados de estudio a estudio?

2.- ¿Cuáles son los resultados?

¿Cuáles son los resultados globales de la revisión de conjunto?

¿Hasta qué punto fueron precisos los resultados?

3.- ¿Pueden aplicarse los resultados en la asistencia a mis pacientes?

¿Se consideran todos los resultados clínicamente importantes?

¿Los beneficios compensan los inconvenientes y los costes?

El periodo de búsqueda incluyó de enero del 2007 a agosto de 2012.

b) *Evaluación de la calidad de los estudios.* Se realizó mediante el nivel y calidad de la evidencia clínica (Tablas de la I a la VI)

TABLA No. I  
NIVELES DE CALIDAD DE LA EVIDENCIA CIENTÍFICA

I	Evidencia obtenida a partir de al menos un ensayo aleatorizado y controlado diseñado de forma apropiada
II-1	Evidencia obtenida a partir de ensayos controlados no aleatorizados y bien diseñados
II-2	Evidencia obtenida a partir de estudios de cohorte o caso-control bien diseñados, realizados preferentemente en más de un centro o por un grupo de investigación
II-3	Evidencia obtenida a partir de múltiples series comparadas en el tiempo con o sin intervención <sup>a</sup>
III	Opiniones basadas en experiencias clínicas, estudios descriptivos o informes de comités de expertos

Fuente :Oxman AD, Guyatt GH et al. User's Guides to The Medical Literature VI. How to use an overview. JAMA 1994; 272 (17): 1367-1371.

TABLA No.II  
CLASIFICACIÓN DE LA EVIDENCIA CIENTÍFICA SEGÚN EL RIGOR CIENTÍFICO

1	Ensayo controlado y aleatorizado con una muestra grande
2	Ensayo controlado y aleatorizado con una muestra pequeña
3	Ensayo no aleatorizado con controles coincidentes en el tiempo
4	Ensayo no aleatorizado con controles históricos
5	Estudio de cohorte
6	Estudio de casos y controles
7	Estudios transversales
8	Vigilancia epidemiológica (bases de datos o registros)
9	Serie consecutiva de casos
10	Notificación de un caso aislado (anécdota)

Fuente :Oxman AD, Guyatt GH et al. User's Guides to The Medical Literature VI. How to use an overview. JAMA 1994; 272 (17): 1367-1371.

TABLA No.III

NIVELES DE CALIDAD DE LA EVIDENCIA CIENTÍFICA

Nivel	Tipo de diseño	Condiciones de rigurosidad científica*
I	Metaanálisis de ensayos controlados y aleatorizados	No heterogeneidad Diferentes técnicas de análisis Metarregresión Megaanálisis Calidad de los estudios
II	Ensayo controlado y aleatorizado de muestra grande	Evaluación del poder estadístico Multicéntrico Calidad del estudio
III	Ensayo controlado y aleatorizado de muestra pequeña	Evaluación del poder estadístico Calidad del estudio
IV	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado	Controles coincidentes en el tiempo Multicéntrico Calidad del estudio
V	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado	Controles históricos Calidad del estudio
VI	Estudios de cohorte	Multicéntrico Apareamiento Calidad del estudio
VII	Estudios de casos y controles	Multicéntrico Calidad del estudio
VIII	Series clínicas no controladas Estudios descriptivos: vigilancia epidemiológica, encuestas, registros, bases de datos Comités de expertos	Multicéntrico
IX	Anécdotas o casos únicos	

Fuente :Oxman AD, Guyatt GH et al. User's Guides to The Medical Literature VI. How to use an overview. JAMA 1994; 272 (17): 1367-1371.

TABLA No. IV

IDONEIDAD DE LAS RECOMENDACIONES SEGÚN LA CALIDAD DE LA EVIDENCIA CIENTÍFICA

Grado de las recomendaciones	Niveles de calidad
A: existe ADECUADA evidencia científica para recomendar la adopción de la tecnología	I II-1
B: existe CIERTA evidencia científica para recomendar la adopción de la tecnología	II-1 II-2
C: existe una INSUFICIENTE evidencia científica, por lo que la decisión de adoptar la tecnología debe basarse en otros criterios	II-3 III
D: existe una CIERTA evidencia científica para recomendar la no adopción de la tecnología	II-1 II-2
E: existe una ADECUADA evidencia científica para recomendar la no adopción de la tecnología	I II-1

Fuente :Oxman AD, Guyatt GH et al. User's Guides to The Medical Literature VI. How to use an overview. JAMA 1994; 272 (17): 1367-1371.

TABLA No. V

RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE LA CALIDAD DE LA EVIDENCIA CIENTÍFICA Y EL GRADO DE RECOMENDACIÓN

Nivel de calidad de la evidencia científica	Grado de recomendación <sup>a</sup>
I: ensayos aleatorizados con una muestra grande y resultados bien definidos (y un riesgo bajo de error estadístico tipo $\alpha$ y $\beta$ )	A
II: ensayos aleatorizados con una muestra pequeña (y un riesgo moderado a alto de error estadístico tipo $\alpha$ y $\beta$ )	B
III: estudios no aleatorizados, controles concurrentes en el tiempo	C
IV: estudios no aleatorizados, controles históricos	
V: estudios no controlados, series clínicas	

Fuente: Oxman AD, Guyatt GH et al. User's Guides to The Medical Literature VI. How to use an overview. JAMA 1994; 272 (17): 1367-1371.



TABLA No. VI  
 NIVELES DE EVIDENCIA CIENTÍFICA DE CADA UNO DE LOS ARTÍCULOS  
 INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Referencia	Niveles de la calidad de la evidencia científica	Clasificación de la evidencia científica según el rigor científico	Niveles de la calidad de la evidencia científica	Idoneidad de las recomendaciones según la calidad de la evidencia científica	Relación entre los niveles de la calidad de la evidencia científica y el grado de recomendación
34	III	8	VIII	II-1	V: C
35.	III	8	VIII	II-1	V: C
36	III	8	VIII	II-1	V: C
37	III	8	VIII	II-1	V: C
38	I	2	III	II-1	II: A
39	II-1	1	II	II-1	I: A
40	I	2	III	II-3	II:B
41	II-2	6	VII	II-1	III:B
42	III	8	VIII	II-1	V: C
43.	II-1	1	II	II-1	I: A
44	I	2	III	II-3	II:B
45.	III	8	VIII	II-1	V: C
46.	II-2	1	II	II-1	I: A
47.	II-2	1	II	II-1	I: A
48.	II-3	2	III	II-3	II:B
49.	III	8	VIII	II-1	V: C
50.	III	8	VIII	II-1	V: C
51.	III	8	VIII	II-1	V: C
52	II-2	2	III	II-3	III-B
53.	III	8	VIII	II-1	V: C

d) *Recolección de los datos y control de los procesos.* Para la recolección de los datos se procedió de la siguiente manera:

1. Determinando el nivel de evidencia de los estudios para agrupar los artículos por nivel
2. Se realizaron matrices de resumen de doble entrada en el que se consideraron los siguientes datos
  - Autores
  - Título del artículo
  - Tamaño de la muestra
  - Prueba estadística utilizada
  - Resultados obtenidos

e) *Síntesis de los datos.* Para la presentación de los datos se realizaron cuadros y gráficas empleando media y desviación estándar

## **ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES**

Actualmente, la mayoría de las preguntas en el campo de la biología celular se enfocan en saber qué es lo que sucede con las células integrantes de un sistema, cómo son las interacciones dentro del mismo y, sobre todo, cuáles son las propiedades individuales de cada una. Estas preguntas han llevado a la necesidad de aislar subpoblaciones y subcomponentes celulares, generalmente para enriquecer poblaciones o para eliminarlas.

Para alcanzar estos objetivos, el primer paso en el proceso de aislamiento es la identificación y clasificación de las células. La clasificación de las células puede basarse en propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y funcionales. Los métodos de clasificación que se basan en propiedades funcionales utilizan características tales como afinidad, adherencia o crecimiento. La clasificación inmunológica se basa en la utilización de anticuerpos dirigidos contra epítopes celulares. En la práctica, las características fisicoquímicas son las más utilizadas para la separación o “sorteo celular”; se incluyen características como tamaño, volumen, densidad, propiedades de dispersión de la luz, potencial de membrana, pH, carga eléctrica y contenido celular de diferentes compuestos como ácidos nucleicos, enzimas y otras proteínas .

En los últimos años ha habido un incremento en las técnicas que utilizan más de una característica celular para clasificar y separar diferentes subconjuntos celulares y componentes subcelulares. Estas técnicas pueden agruparse básicamente en separación gruesa y separación de células individuales. La separación gruesa se refiere a métodos tales como la filtración celular, la centrifugación o sedimentación y el cultivo celular. La separación de células individuales se refiere principalmente a la citometría de flujo que, enriquecida con el “sorteo celular”, es la mejor técnica para proveer información en cuanto al análisis y separación de poblaciones celulares.

El término inmunofluorescencia se usa para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo. Ya en 1941 informó de la aplicación de esta técnica para localizar antígenos y anticuerpos en secciones de tejido. El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Kohler y Milstein en 1975, incrementó dramáticamente el uso de la inmunofluorescencia para la identificación de antígenos de superficie celular.

La citometría de flujo es un proceso que permite que las células (500 – 4000/ seg) pasen en fila dentro de un flujo a través del aparato. Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen<sup>34</sup>. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia. Al mismo tiempo, es posible separar las poblaciones definidas por éste análisis. Estas ideas son la base de la técnica conocida como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), el cual proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. Para llevar a cabo lo anterior, el aparato necesita de un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora. El sistema de citometría de flujo está compuesto por cinco unidades principales: una fuente de luz (lámpara de mercurio o láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos.

Para que el funcionamiento del FACS se lleve a cabo, es necesario que una suspensión celular se inyecte al flujo laminar donde las células pasan una después de la otra a través de un capilar y llegan hasta un rayo láser. Cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula y esto genera información. La luz dispersada hacia delante provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular. Si la célula va marcada con un fluorocromo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por la computadora del citómetro. (fig. 1)

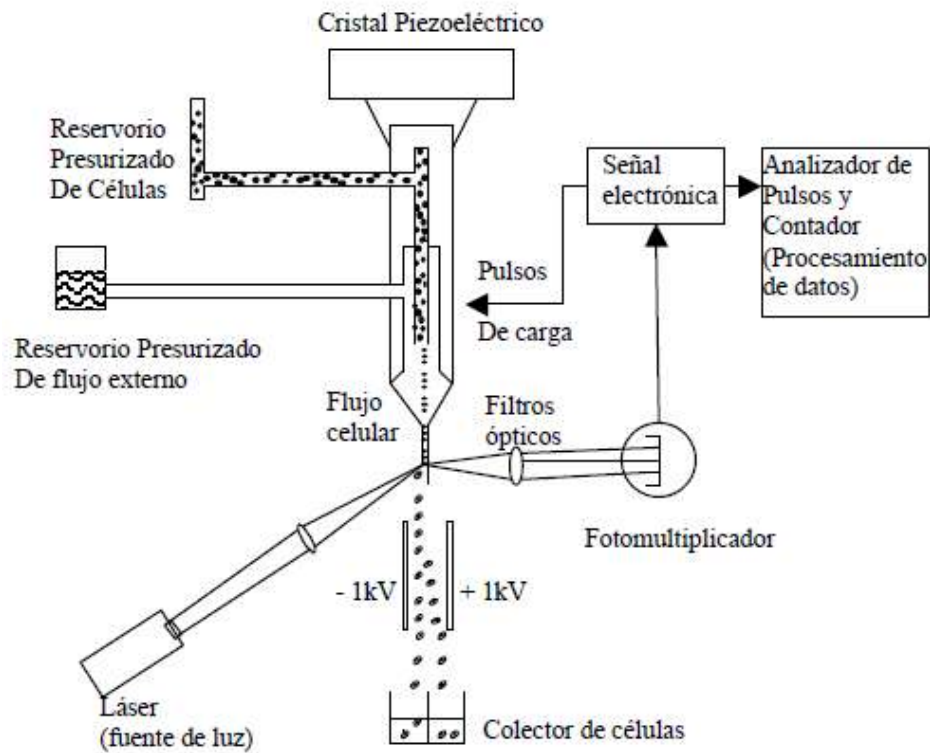


Figura No. 1: Representación esquemática de los componentes del citómetro de flujo. Fuente: referencia No, 34

El FACS posee una unidad de sorteo que ofrece la posibilidad de separar subpoblaciones seleccionadas. Las células se cargan eléctricamente y las gotas resultantes se desvían al pasar a través de un campo eléctrico

## **Descripción y función de los componentes del aparato**

### **Sistema de flujo**

El sistema de flujo del FACS posee un capilar a través del cual se hace pasar un líquido isotónico, a manera de una funda, con una velocidad y presión constante; estas características son necesarias para la formación de un flujo laminar (sin turbulencia). Al mismo tiempo, por el centro del capilar se hace pasar la suspensión celular, con aproximadamente de  $5 \times 10^5$  a  $2 \times 10^7$  células/mL y a una presión mayor que la del flujo acarreador. Este enfoque hidrodinámico se asegura de que las células permanezcan centradas y viajen una tras otra en el chorro de inyección (Figura 2). Este confinamiento es necesario para hacer mediciones precisas, es decir para el análisis individual de las células.

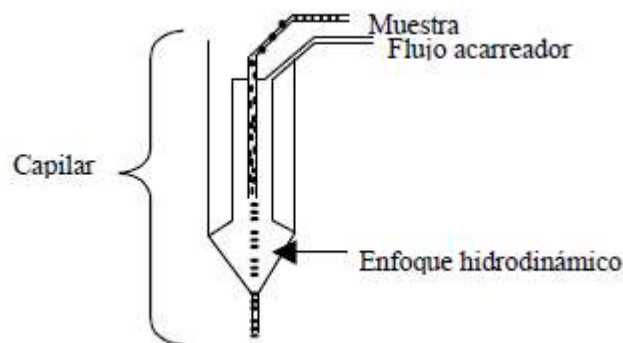


Figura No. 2: La muestra pasa por un flujo laminar producido por otro líquido isotónico y esto hace que las células viajen ordenadas una tras otra. Fuente: Referencia No. 34

### **Sistema óptico**

La fluorescencia y la luz dispersada se producen cuando una célula contenida en el líquido inyectado pasa por el rayo enfocado de un láser. La luz dispersada hacia el frente es colectada por un detector que capta la luz difractada entre  $1$  y  $10^\circ$  arriba o abajo del punto de incidencia del láser. La luz dispersada lateralmente y la fluorescencia son colectadas por un lente que está a  $90^\circ$  del eje de incidencia del láser. Esta luz lateral y la fluorescencia son divididas por un “beamsplitter” (Divisor del rayo) para separar entre la luz difractada y la fluorescencia. La fluorescencia es a su vez dividida por un espejo dicróico que

permite distinguir entre diferentes longitudes de onda. Cada detector de fluorescencia tiene otros filtros ópticos para excluir la luz del láser dispersada y para dejar pasar la luz con la longitud de onda deseada para ese detector (Figura 3).

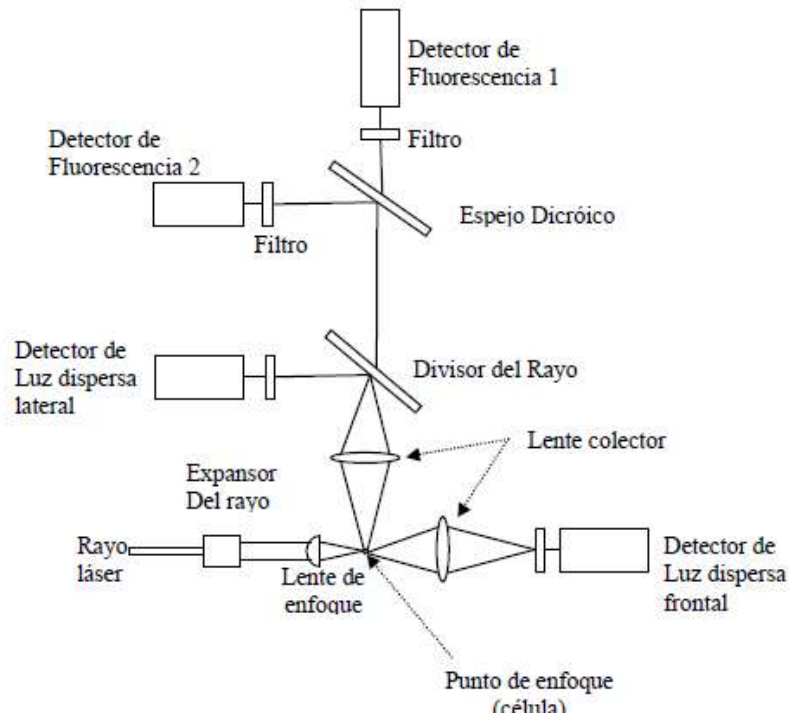


Figura No. 3 Sistema Óptico del FACS: El láser incide en la célula y está dispersa la luz de manera lateral y frontal al tiempo que emite fluorescencia. La luz y la fluorescencia son detectadas por separado. Fuente: referencia No, 34

### *Sistema eléctrico*

Para la obtención física de las poblaciones celulares, es necesario que las células vayan en gotas aisladas y con una marca que permita distinguir y separar una población de otra.

Cuando una célula atraviesa el rayo láser, se ilumina por varios microsegundos y durante ese tiempo emite un pulso fluorescente. Si este pulso cae en los límites de amplitud predeterminados, se genera eléctricamente un pulso cargado. Este pulso toma en cuenta la demora que hay entre el evento de la célula estando incidida por el láser y la célula estando en el lugar donde debe formarse la gota. Este pulso llega a un cristal piezoeléctrico que está conectado a la estructura

por la que pasa el capilar. Este artefacto se expande y contrae ligeramente cuando se aplica un voltaje y este movimiento guía a un oscilador que hace vibrar la estructura por donde pasa el capilar. La vibración lleva una frecuencia cercana a la frecuencia con la que naturalmente el flujo se rompe en una gota. Esto estabiliza la formación de la gota en esa frecuencia, resultando en una gota de tamaño uniforme y una demora de tiempo bien definida entre la detección de una célula por el rayo del láser y la incorporación de la célula a una gota libre. Si la célula se va a sortear, un potencial en el orden de los 100 V se aplica, mediante un electrodo, al fluido (isotónico) que va dentro del capilar.

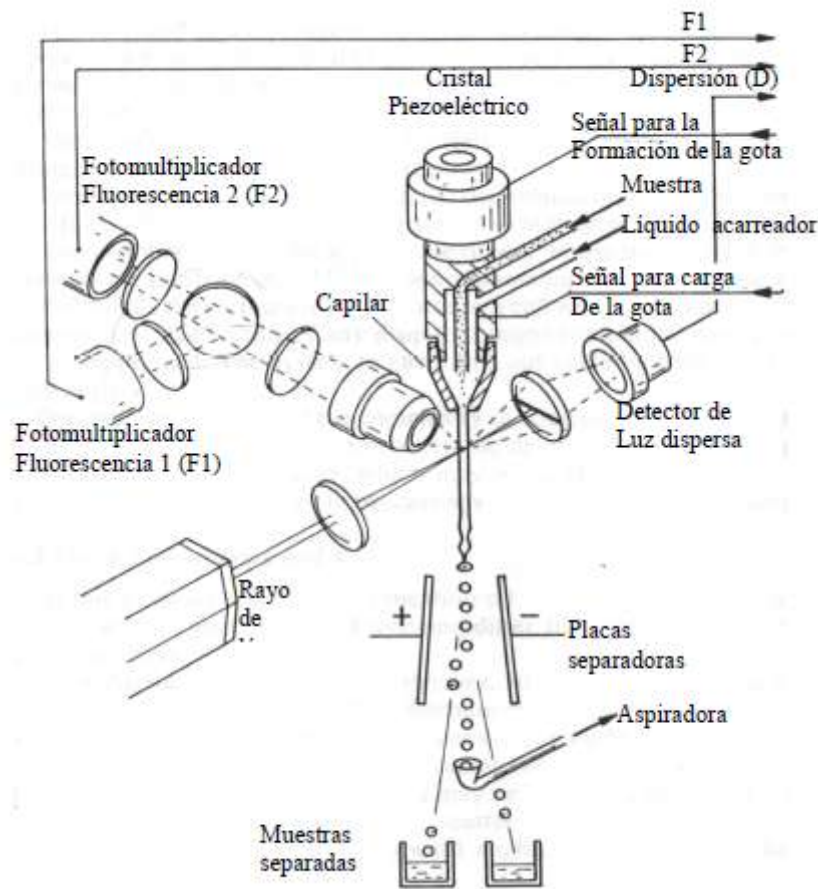


Figura No. 4 Las señales luminosas son colectadas y transformadas en pulsos eléctricos que regresan a la estructura central y forman y dan carga eléctrica a la gota, al estar cargadas las células pueden separarse. Fuente: referencia No, 34



La conductividad eléctrica del fluido asegura que cualquier gota que se separa de la inyección, mientras se aplica el voltaje, llevará una carga eléctrica. La duración del voltaje aplicado se escoge para cargar una o más gotas que puedan contener a la célula deseada. Se pueden sortear dos poblaciones de células al mismo tiempo al aplicar una carga positiva a gotas que contengan una población y una carga negativa a gotas que contengan otra población. La hilera de gotas pasa entre dos placas cargadas el separando las gotas cargadas de las no cargadas. Las gotas que no se desplazan se remueven por una aspiradora y las que se desplazan se colectan en los recipientes adecuados (Figura 4).

El sistema electrónico también está involucrado con la amplificación de las señales que salen de los detectores, tanto de fluorescencia como de luz dispersa, y con el procesamiento de los datos para su evaluación (Figura 5)

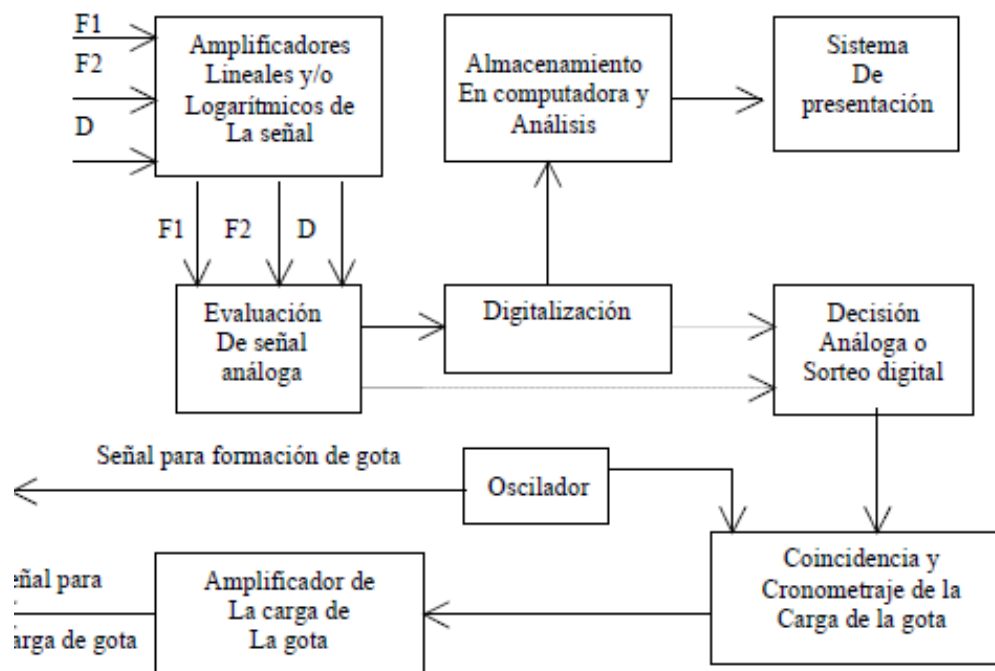


Figura No. 5. Procesamiento de las señales luminosas en las señales eléctricas necesarias para la separación de las muestras y su análisis. Fuente: referencia No, 34

### *Obtención de los datos e interpretación*

El aparato de FACS va acompañado por una computadora que adquiere los datos proporcionados por el sistema eléctrico y hace una presentación gráfica. La computadora produce un histograma o un despliegue de dos parámetros (dot plot) a partir de la luz dispersada por las células o a partir de la fluorescencia. El análisis de los datos generalmente se complica porque el volumen de la muestra puede ser variable y por la complejidad de ésta, por lo que es esencial que la forma de interpretación se diseñe específicamente para contestar a las preguntas que se formularon en la investigación.

En la interpretación de estos resultados, el establecimiento de controles negativos y positivos es crítico, ya que definirán la localización de la población de interés. Por ejemplo, si se quiere distinguir una población de células positiva para cierta fluorescencia, el límite mínimo del área de interés deberá definirse de manera que incluya únicamente a ese tipo de células. Para lograr esto, es necesario tener un control positivo que sirva como base para la definición del área positiva. Si el límite mínimo se establece cerca de la zona donde se encuentran las células negativas, la frecuencia de las positivas podría sobreestimarse o subestimarse dependiendo de la señal de fondo que den los marcadores. Después de tener todos los controles positivos se pueden seleccionar ventanas donde se analicen experimentos individuales <sup>35</sup>.

### *Aplicaciones*

En general, el FACS se utiliza para analizar y separar células según características definidas. Actualmente, el desarrollo y uso de anticuerpos monoclonales específicos para moléculas de superficie hacen posible la definición y estudio de subpoblaciones celulares que no son posibles utilizando otras técnicas.

Además del análisis de poblaciones celulares específicas, el FACS se ha vuelto una herramienta en la farmacología, la toxicología, la bacteriología, virología, ciencias ambientales y en el monitoreo de bioprocesos. A través de la

dispersión de la luz, la fluorescencia y la absorbancia de las células teñidas o no teñidas, se pueden medir un gran número de parámetros celulares <sup>36</sup>.

Con respecto a la medición utilizando la luz dispersada, en el citómetro, la luz que se dispersa hacia el frente se utiliza para determinar el tamaño de la célula. Para lograrlo se necesita calibrar el aparato con cuentas de poliestireno que tengan tamaños definidos. Aun así, el error puede ser grande ya que las mediciones están influenciadas por el índice de refracción de las partículas. Además de medir el tamaño, se pueden combinar otras características para determinar a un grupo de células.

La mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia. Los parámetros celulares que pueden medirse se caracterizan en extrínsecos o intrínsecos, dependiendo del reactivo que se necesite. Para los ensayos de fluorescencia intrínseca no se necesita un pretratamiento como fijación, tinción o lavados. Los estudios sobre componentes celulares específicos utilizando fluoróforos (fluorescencia extrínseca) requieren una tinción previa al análisis de las células.

En definitiva, las ventajas que ofrece el FACS en cuanto a la separación de componentes subcelulares o subpoblaciones celulares son difíciles de superar ya que, además de hacer la separación física de las células de interés, se puede hacer una medición cuantitativa y multiparamétrica de ciertas características celulares en una mezcla compleja y estadísticamente adecuada de células. En general, el FACS es una herramienta muy útil que puede dar muchos más datos sobre las poblaciones celulares y que no ha llegado al límite de su aplicabilidad <sup>37</sup>.

## INMUNOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS

En la última década, han adquirido particular interés los aspectos inmunológicos de la enfermedad, dado que tanto en mujeres sanas como en las que padecen la enfermedad han sido aisladas células endometriales viables durante la menstruación. De ello se desprende que algún tipo de alteración del sistema inmunológico facilitaría el desarrollo de la enfermedad, en aquellas mujeres propensas.

El sistema inmunológico lleva a cabo una compleja serie de acciones, que permiten al organismo defenderse de la agresión de sustancias o microorganismos extraños. Dentro de condiciones normales, los monocitos o macrófagos circulantes se encargan del reconocimiento y procesamiento de determinantes antigénicas, que serán luego presentados al grupo de linfocitos T ayudadores/inductores (CD4), los cuales mediante la producción de las interleucinas I y II inducen expansión clonal de estas líneas celulares incluyendo las células asesinas naturales. De modo paralelo, los linfocitos B bajo el estímulo antigénico y de las interleucinas I-II-IV y V a través de un proceso de expansión clonal, se encargan de la producción de anticuerpos específicos, los cuales, participan en la eliminación de antígenos así como en la activación del complemento.<sup>38</sup>

En fases iniciales de la enfermedad el sistema inmunológico monta una respuesta con base en el reconocimiento antigénico del tejido ectópico, el cual genera respuesta de monocitos, macrófagos y células asesinas naturales, detectadas a nivel del líquido peritoneal con altos niveles de IL-1, IL-2, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa, interferón, C3 y C4, de hecho se ha podido evidenciar la disminución en el reconocimiento y en la intensidad de la respuesta inmune contra los antígenos endometriales autólogos, en pacientes con endometriosis.

Mediante el cultivo de células inmunes y células endometriales, de pacientes sanas y con endometriosis, pudieron observarse diferencias significativas entre unas y otras, relacionadas con la actividad de los macrófagos peritoneales y los

monocitos circulantes en sangre periférica. Por lo general, los macrófagos localizados en el peritoneo, y los monocitos circulantes, suprimen la proliferación del tejido endometrial *in vivo* e *in vitro*. No obstante, los monocitos de las pacientes con endometriosis, estimulan el crecimiento del endometrio *in vivo*, a diferencia de lo que se observa en controles

Las células endometriales descamadas y con capacidad de infiltración tisular, se fijan sobre el peritoneo y puesto que la respuesta inmune está disminuida, proliferan con facilidad y se organizan, formando las lesiones características.

Estudios sobre la función del sistema monocito/macrófago que desempeña un papel primordial en el mantenimiento de la inmunidad humoral y mediada por células, evidencian su papel modulador sobre la acción de las células NK. Se observa una disminución de la función de las células NK cuando éstas se colocan en un medio que contenga fluido peritoneal de pacientes con endometriosis (Figura 6).

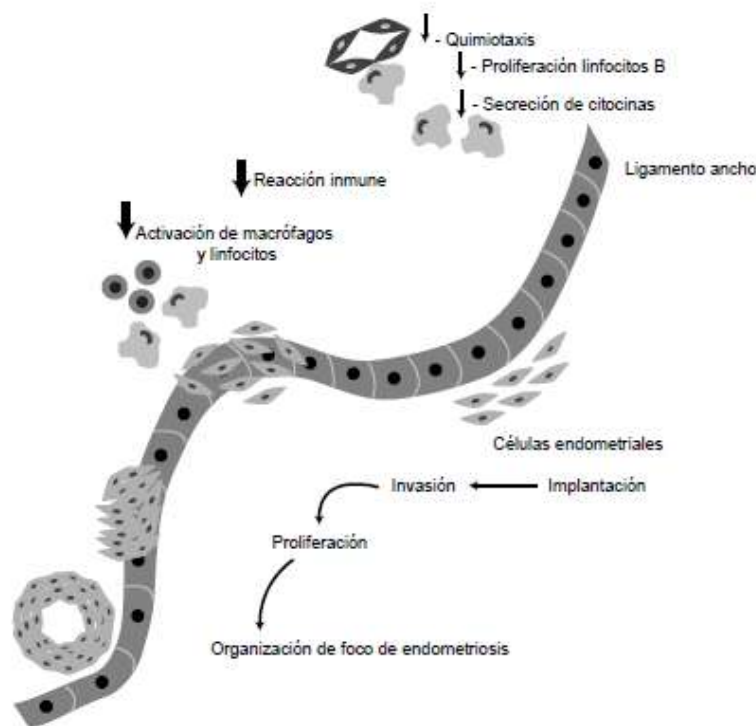


Figura No. 6 . Secuencia de eventos que conduce a la aparición de un foco de endometriosis Fuente: referencia No, 40

Desde la pasada década, varios grupos de investigadores han reportado alteraciones de tipo funcional a nivel de la inmunidad humoral y celular, con aumento en el número de linfocitos T ayudadores respecto de los supresores, tanto a nivel periférico como de la cavidad peritoneal, que se traduce en aumento de los autoanticuerpos y otras alteraciones de la inmunidad humoral<sup>39</sup>.

La proporción de linfocitos ayudadores puede verse aumentada en sangre periférica y en la cavidad peritoneal. Este cambio puede generar alteraciones de la inmunidad celular y una exagerada síntesis de anticuerpos. Así mismo, se ha documentado reducción de la proliferación clonal de células B timodependientes en respuesta a antígenos endometriales heterólogos, de hecho se ha demostrado la disminución de la respuesta linfocitaria y actividad citotóxica en respuesta a la inoculación de antígenos endometriales autólogos, como consecuencia probablemente de una disminución en la capacidad de reconocimiento antigénico en estas líneas celulares. Algunos estudios informan de resistencia celular a la destrucción mediada por células citotóxicas en pacientes con endometriosis, de lo que puede deducirse, que la alteración no es solo a nivel del sistema inmunológico, sino también a nivel de las células del tejido endometrial.

Desde el punto de vista histológico las lesiones de la endometriosis pueden presentarse de múltiples formas, aunque se han descrito algunos patrones básicos. En general la implantación del tejido endometrial ectópico comienza por el desarrollo de quistes microscópicos (endometriosis microscópica) que según su localización pueden ser intramesoteliales o submesoteliales.

A medida que el proceso de proliferación continúa, debido a la acción de las hormonas liberadas con cada ciclo menstrual, aumenta la vascularización del tejido aberrante, la actividad de las glándulas endometriales y la descamación del mismo, lo que incrementa el tamaño del quiste. De esta manera se originan las denominadas lesiones tempranas, que pueden corresponder a estructuras vesiculares con una apariencia rojiza característica al examen laparoscópico. Las pápulas y vesículas siguen creciendo y cada vez se acumula más material hemorrágico en el interior del quiste y las paredes del mismo se adelgazan en forma progresiva; además, el estudio histológico evidencia la presencia de un

proceso de fibrosis y reacción inflamatoria. A medida que pasa el tiempo los focos endometriósicos cambian de color, tornándose violáceos (lesiones negro-azuladas), constituyendo la endometriosis avanzada. (Figura 6 supra) A medida que aumenta la fibrosis, disminuye la respuesta del tejido ectópico a los estímulos hormonales, pero no desaparece por completo; los cambios inflamatorios y fibróticos se hacen más prominentes y terminan por conducir al desarrollo de áreas blanquecinas, constituidas por tejido fibroso en su mayor parte, carentes de estroma y con un mínimo contenido de glándulas endometriales inactivas; estos cambios corresponden a la endometriosis cicatricial <sup>40</sup> (Figura 6 Infra).

Además de los cambios anatómicos que se suceden como consecuencia del proceso inflamatorio persé en respuesta a la actividad cíclica del endometrio ectópico, han surgido otra serie de teorías que pretenden explicar los aspectos fisiopatológicos de la infertilidad secundaria a endometriosis.

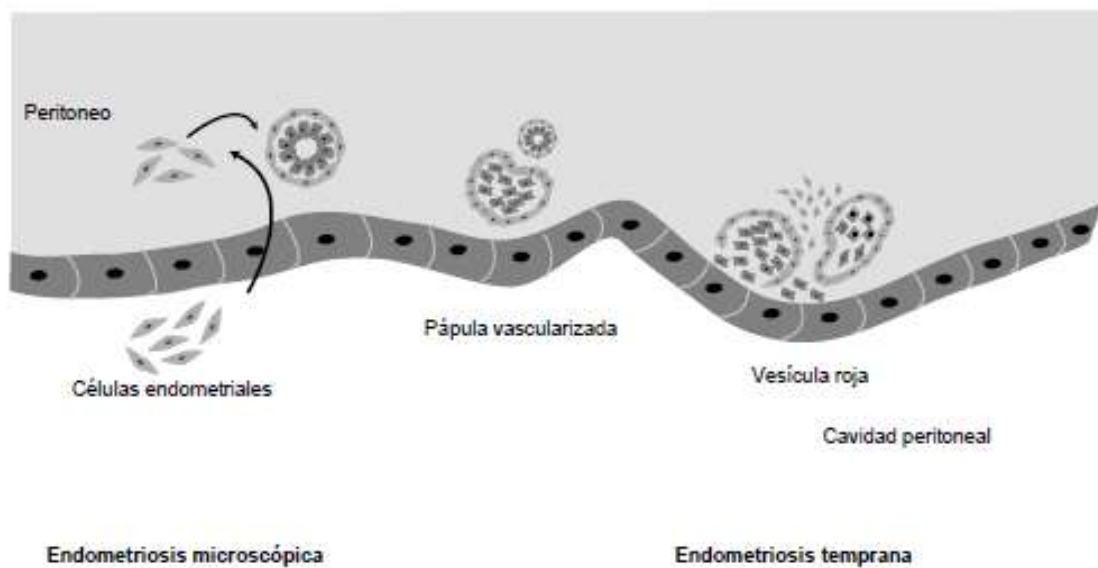


Figura No. 6 . Supra. Distintas etapas de las lesiones endometriósicas desde los focos microscópicos hasta las placas fibrosas residuales  
Fuente: referencia No, 40

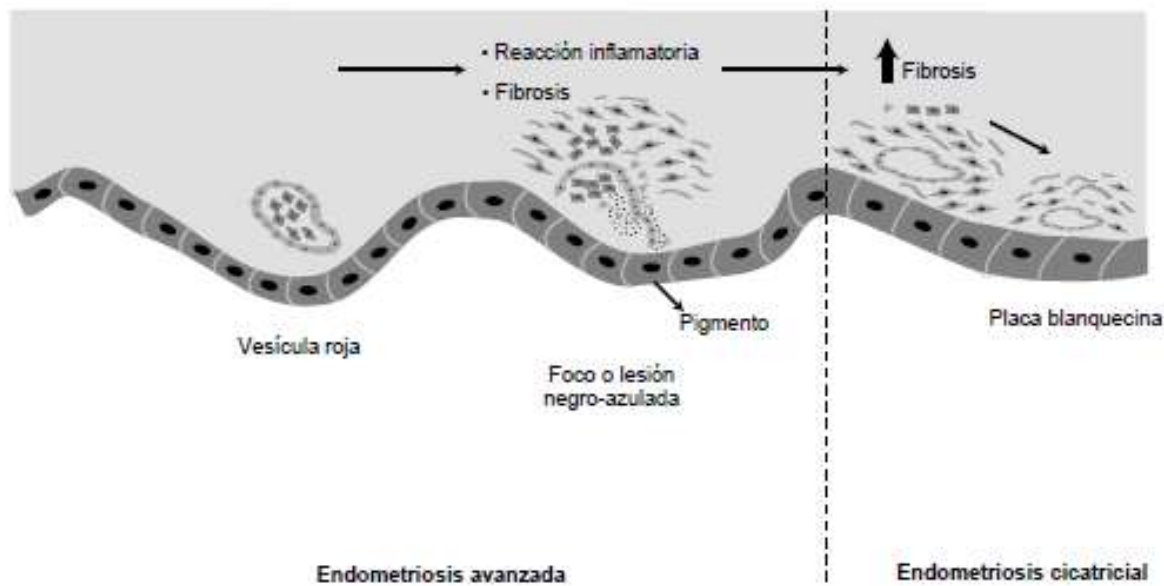


Figura No. 6 . Infra. Distintas etapas de las lesiones endometriósicas desde los focos microscópicos hasta las placas fibrosas residuales  
Fuente: referencia No, 40

Están primero los macrófagos peritoneales que han sido involucrados en pacientes con enfermedad de leve a moderada, como mediadores de la infertilidad. En varios estudios ha sido reportado que la enfermedad cursa con niveles elevados de macrófagos en líquido peritoneal, con particular relevancia a nivel de las tubas uterinas. La activación de los macrófagos como consecuencia del proceso inflamatorio lleva a la producción y liberación de tromboxano A2 y otros factores que interfieren con la ovulación, formación del cuerpo lúteo y con la motilidad de los espermatozoides.

Las prostaglandinas han sido también implicadas en la génesis de la infertilidad en éstas pacientes. Estos compuestos son producidos en grandes cantidades a nivel del tejido endometrial en sí, y en los focos ectópicos además como consecuencia del proceso inflamatorio. La prostaglandina F2 incrementa el tono y la amplitud de la musculatura uterina generando dismenorrea. Teóricamente, alteraciones con los niveles de prostaglandinas en pacientes con endometriosis podrían ocasionar problemas en la implantación o la placentación.



Las linfocinas son otras sustancias que han sido implicadas en la génesis de este trastorno. Es así como la interleucina-1 mediador de la respuesta inflamatoria ha demostrado ser lesiva para el crecimiento embrionario en fase tempranas <sup>41</sup>.

Además, la fase folicular en pacientes con endometriosis es más corta que en mujeres sanas, con niveles de estradiol que pueden estar bajos, y de progesterona dentro de lo normal. Hay marcada tendencia a la maduración de un mayor número de folículos, por norma más pequeños al momento del pico de hormona luteinizante. Puede también presentarse en pacientes con enfermedad avanzada y empastamiento pélvico, la no ruptura del folículo De Graaf, que lleva también a infertilidad (Figura 7)

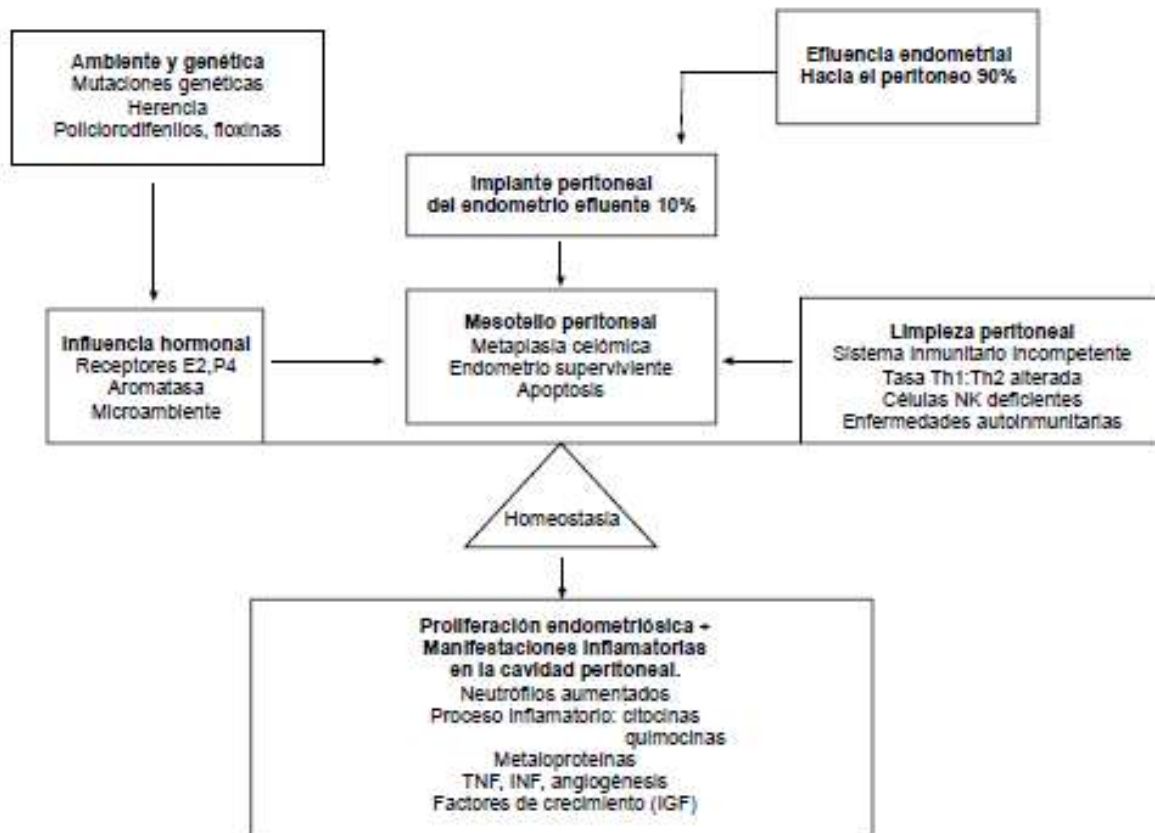


Figura No. 7 .Hipótesis de la patogenia de la endometriosis. Fuente: referencia No, 1

Se han propuesto estadios que manejan desde el punto de vista inmunológico la formación de una zona de endometrio ectópico, las cuales son:

1.- *Fase de Contacto* . Sampson propuso que la sangre menstrual regurgitada actuaba como irritante de la superficie peritoneal facilitando así la implantación del endometrio. Existe la hipótesis de que los cambios en la actividad fibrinolítica intraabdominal puede desempeñar un papel en el desarrollo de endometriosis y la formación de adherencias. En las pacientes con endometriosis se ha visto una disminución en la actividad fibrinolítica intraabdominal de las células mesoteliales que recubren el peritoneo. La combinación de exudado de fibrina, desarrollado como consecuencia del daño peritoneal y la disminución de la actividad fibrinolítica puede llevar a la formación de adherencias<sup>40,42</sup>

Por otro lado el factor de crecimiento del endotelio vascular/factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF) es responsable del aumento de la permeabilidad vascular y de la extravasación del fibrinógeno como ocurre en los fenómenos inflamatorios. VEGF es producido en grandes cantidades por las células endometriales hipóxicas durante la menstruación y por macrófagos activados del flujo menstrual y de la cavidad peritoneal. Es posible que el sangrado menstrual pueda inducir respuesta semejante en el peritoneo, lo que facilitaría la adhesión de las células endometriales y la neoangiogénesis.

Durante la inflamación, los Polimorfonucleares (PMN) se acumulan antes de la llegada de los macrófagos. Aunque la presencia de PMN en peritoneo es transitoria, estas células también constituyen una amenaza para el mesotelio. Los PMN activados producen enzimas proteolíticas y metabolitos reactivos de oxígeno que oxidan proteínas y membranas produciendo una lesión importante en mesotelio y por tanto facilitando la extravasación<sup>40,43</sup> .

2. *Fase de Adhesión*. El ciclo endometrial requiere, recurrentemente, el crecimiento de nuevos vasos capilares; sin embargo, la respuesta angiogénica en el endometrio parece estar estrictamente controlada con el crecimiento acelerado de vasos nuevos, seguida de marcada inhibición del crecimiento. Después de la

fase de contacto debe llegar el momento en el que el tejido endometrial se adhiere al peritoneo. Así, la angiogénesis endometriósica tiene un gran parecido con la observada en el crecimiento tumoral; lo cual, en ambos casos, parece estar controlado por esteroides vía factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Por lo tanto, en el crecimiento tumoral, una vez que un tumor se establece, se presenta una fase prevascular incierta y larga durante la cual el tumor está latente, y es seguida por una fase intensa de proliferación celular endotelial. Esto significa que existe un disparo angiogénico y el posterior crecimiento tumoral. Los estudios histológicos y experimentales mostraron que los depósitos endometriósicos obtienen su aporte sanguíneo del sistema microvascular. Así, surgen grandes depósitos en áreas con una rica vascularidad; por lo tanto, los depósitos endometriales iniciales podrían ser el detonante angiogénico dentro y alrededor del tejido. Las citocinas, que posiblemente son capaces de inducir un fenotipo angiogénico en la endometriosis, incluyen IL-1B, IL-6, IL-8, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor 2 de crecimiento fibroblástico (basic-FGF), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El líquido peritoneal de mujeres con endometriosis contiene, significativamente, más actividad angiogénica que el líquido pélvico de controles normales, y las concentraciones en el líquido peritoneal del VEGF se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, las concentraciones de RNAm del VEGF en el tejido ectópico no se ven alteradas en comparación con las del endometrio eutópico. El incremento comprobado sugiere que la familia de VEGF podría estar involucrada tanto en el inicio como en el mantenimiento de la endometriosis peritoneal, ya que se demostró que el VEGF se manifiesta por endometrio eutópico, endometrio ectópico y por macrófagos del líquido peritoneal<sup>44</sup>.

Una característica decisiva para la aparición de endometriosis es la capacidad de las células endometriósicas para adherirse a las diversas estructuras abdominales y no abdominales. Si pudiera determinarse algún factor decisivo que regule esta capacidad, potencialmente podría controlarse el desarrollo de focos endometriósicos y con ello buscar un tratamiento. Debido a su similitud en

contenido con las citoqueratinas del epitelio y de componentes de la matriz extracelular, en 1996 Van der Linden y colaboradores evaluaron la habilidad de fragmentos de endometrio en fase proliferativa para adherirse a una membrana amniótica en un estudio in vitro. La membrana amniótica es similar al peritoneo con respecto a la proliferación de citoqueratinas y en los componentes de su matriz extracelular. El tejido endometrial no se adhirió a la membrana amniótica. Los autores llegaron a la conclusión de que la integridad del epitelio podía prevenir esta adherencia durante el fenómeno de menstruación retrograda. Posterior a este estudio, Groothuis y colaboradores, realizaron otro estudio ahora con tejido endometrial en fase proliferativa y secretora para demostrar la capacidad de adherencia al amnios. Encontrando que sólo en regiones donde el epitelio amniótico tenía lesiones o estaba ausente podía ocurrir esta adhesión sobre la membrana basal expuesta. Por lo anterior se concluyó la hipótesis de que el trauma en el mesotelio es un prerrequisito para la adhesión celular de endometrio. Otros estudios demostraron que a mayor tiempo de exposición del tejido endometrial con el mesotelio se lograba adhesión aunque en menor porcentaje. En 10% de los implantes se identificaron áreas de adhesión en mesotelio intacto. Estos hallazgos se confirmaron en estudios posteriores y se estableció que las células endometriósicas podían adherirse al mesotelio intacto. Con estos antecedentes se procedió a investigar a las moléculas participantes en la adhesión celular al mesotelio. Las integrinas son heterodímeros (cadenas a y b) que adhieren células a la matriz extracelular; sin embargo, no se han detectado diferencias significativas en su expresión entre muestras endometriales y endometriósicas. En otros estudios, los subtipos de integrinas pueden variar y esto podría ser un mecanismo de adaptación al entorno extrauterino. Las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) son integrinas secretadas por citocinas estimuladas por factores como las interleucinas o el factor de necrosis tumoral alfa<sup>39</sup>.

Las moléculas de adhesión celular participan de manera vital en este proceso de aposición y adhesión. Recientemente se ha estudiado dos moléculas, el ácido hialurónico y CD44 las cuales están implicadas en la interacción del mesotelio peritoneal con las células endometriales. El mesotelio peritoneal

produce ácido hialurónico, el cual es expresado a lo largo de la membrana celular de las células de mesotelio peritoneal, contribuyendo a la matriz pericelular y siendo este ácido un componente mayor de la matriz extracelular. CD44 por su parte es el principal receptor de ácido hialurónico. El estroma endometrial y las células epiteliales expresan CD44. Estos hallazgos sugieren que el ácido hialurónico y CD44 juntos están envueltos en la adhesión inicial del endometrio al mesotelio peritoneal <sup>45</sup>

La expresión de moléculas de adhesión intercelular puede verse modificada por factores relacionados con la ciclicidad menstrual. Se ha observado que las células endometriósicas pueden producir moléculas de adhesión celular solubles 1 (sICAM-1) y su producción se acrecienta por el estímulo estrogénico. Otros estudios demuestran que las ICAM-1 pueden ser estimuladas por el interferón g, su expresión aumenta en células de endometrio eutópico, implantes endometriósicos peritoneales y endometriomas ováricos. Este estímulo podría establecer un mecanismo para evadir al sistema inmunitario y promover la supervivencia de células endometriales fuera del útero . Otro punto importante de investigación son los polimorfismos de estas moléculas de adhesión, en donde las pacientes con endometriosis estadio IV tuvieron mayor incidencia del alelo G241R, un polimorfismo de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Estos polimorfismos pueden variar entre distintos grupos étnicos. <sup>39,46</sup>

Las cadherinas son otra familia de proteínas dependientes de calcio que participan en la adhesión celular, aunque su participación en la fisiopatología de la endometriosis ha sido más en torno a la invasividad de estas células, se ha observado que el bloqueo de la adhesión mediada por cadherinas y CD44 le confiere gran invasividad y poder metastásico a las células neoplásicas, por ello se investigó su expresión en células endometriósicas y se encontró menor expresión de cadherina-E y CD44 en las células epiteliales de endometriosis peritoneal vs. células de endometrio sano Cuando se estudió con PCR en tiempo real semicuantitativo el ARN de la cadherina P de lesiones endometriósicas quedó de manifiesto que esta cadherina en particular parece ser la predominante en el

peritoneo; sus concentraciones fueron similares en las lesiones endometriósicas, lo que sugiere un papel central en el desarrollo de la endometriosis.

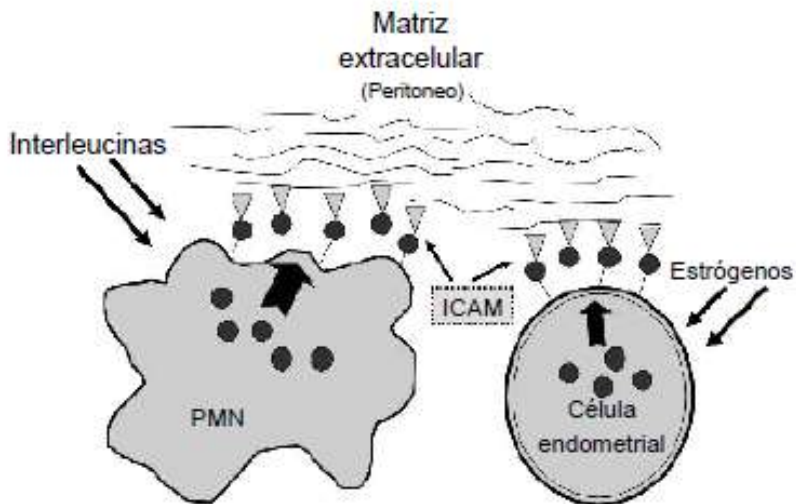


Figura No. 8 .Importancia de la adhesión a la matriz extracelular. Fuente: referencia No, 1

El ácido hialurónico se ha visto expresado en la membrana celular y es un componente decisivo de la matriz extracelular, su principal receptor es el CD44, que se encuentra en varias isoformas. Cuando se evaluó el papel que juega el ácido hialurónico en la adhesión de las células endometriales al mesotelio, se encontró que el pretratamiento con hialuronidasa de las células mesoteliales disminuye la adhesión del estroma endometrial y de células epiteliales a las células mesoteliales del peritoneo o a colágeno tipo IV. Debido a esto se ha llegado a sustentar la hipótesis de que esta adhesividad conferida por el ácido hialurónico podría estar involucrada en el desarrollo de la lesión endometriósica temprana (Figura 8)<sup>1, 41, 47</sup>.

**3. Fase de Invasión** . La invasividad de estas células es un punto clave para la endometriosis. La práctica clínica ha permitido ver cómo estas lesiones llegan a desarrollarse en diferentes tejidos y a gran distancia de la cavidad uterina.

Existen pruebas indirectas que sugieren que las lesiones endometriósicas precoces invaden la matriz extracelular (MEC). La colágena tipo III es uno de los principales componentes de la MEC; su precursor es la pro colágena tipo III, el cual contiene extensiones de péptidos en los extremos amino terminal y carboxiterminal. La conversión de la pro colágena III a colágena conlleva esta eliminación del pro péptido amino terminal. Si existe un proceso activo de invasión de la MEC, se causaría un incremento de la concentración de este pro péptido amino terminal. Se observó que la concentración del pro péptido amino terminal del pro colágeno tipo III estaba significativamente elevado en el líquido peritoneal de las mujeres con lesiones tempranas de la enfermedad, frente a los valores hallados en mujeres sin endometriosis, lo que indica que en la endometriosis, en etapas iniciales, conlleva un proceso activo de remodelación de la MEC.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son las principales enzimas implicadas en la invasión. Las MMPs y sus inhibidores juegan un papel importante en la remodelación endometrial que acompaña a la menstruación. La familia de las MMP contiene endopeptidasas zinc-dependientes que en conjunto son responsables de la degradación de varios componentes de la MEC, como sería colágena, proteoglicanos, laminina, fibronectina y elastina. Los Inhibidores Titulares de Metaloproteinasas (TIMPs), son inhibidores naturales de las MMPs y la expresión de ambas MMPs y TIMPs están estrechamente relacionadas con hormonas esteroideas y citocinas durante cada fase del ciclo menstrual.

Bruner y colaboradores demostraron que el tratamiento de tejido endometrial en cultivo con estrógenos podría mantener la secreción de MMPs y promover la generación de lesiones peritoneales ectópicas cuando se inyectaba ratones inmunodeprimidos. Por otro lado la supresión de MMPs con progesterona o bien el bloqueo de su actividad enzimática con un inhibidor natural de las MMP inhibía esta formación de lesiones endometriósicas ectópicas <sup>48</sup>

Existe una gran cantidad de datos que indican de las MMPs están envueltas en la patogénesis de la endometriosis. En las lesiones de la endometriosis existe una expresión anormal de miembros específicos de las familias de MMPs y TIMPs. La actividad de las MMP en líquido menstrual era diferente de la actividad

encontrada en el líquido peritoneal, por lo que sería preciso una alteración en el balance ente MMP y TIMP a favor de las primeras, para que las células endometriales invadan la MEC y evolucionen en su desarrollo hacia lesiones endometriósicas.

La endometriosis es una enfermedad dependiente de los estrógenos. Se ha demostrado que la enzima aromatasa-citocromo P450 que convierte los andrógenos en estrona y estradiol, se encuentra en el tejido endometriósico y en el endometrio de mujeres con endometriosis. El endometrio normal no expresa cromatadas P450, lo que significa que el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis tiene la capacidad de aumentar la concentración local de estrógenos que produce la proliferación tras su llegada a la cavidad abdominal. Por otro lado se ha comprobado que el endometrio de las mujeres sin endometriosis no es capaz de producir sus propios estrógenos<sup>49</sup>

Por otro lado se ha comprobado que la progesterona regula la expresión endometrial de MMP. Existen factores parácrinos que intervienen en esta regulación como el Factor beta Transformador del Crecimiento (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  es producido por el estroma endometrial en respuesta a la progesterona y puede suprimir la expresión epitelial de MMP-7 independiente de la progesterona. Sin embargo TGF- $\beta$  sólo no puede presentar una sostenida supresión de MMPs, como fue observado después de la administración de tratamiento con progesterona posiblemente por la reasunción de la producción de metaloproteinasas de matriz en ausencia de progesterona. Este hallazgo es consistente por la aseveración de que los niveles de TGF- $\beta$  en el líquido peritoneal están elevados en la endometriosis<sup>41</sup>.

Otra citocina reguladora de la expresión de metaloproteinasas de matriz es la interleucina 1- $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ). La IL-1  $\alpha$  es un potente estimulador de MMP-3, en la fase proliferativa del endometrio en un cultivo orgánico. La exposición a progesterona in vivo reduce la estimulación de IL-1  $\alpha$  para disminuir también la expresión de MMP-3 en la fase secretora. Existen mecanismos aberrante de la expresión de metaloproteinasas de matriz y TIMP en el ambiente de la endometriosis causado por una regulación parácrina anormal, lo que induce a



mayor agresividad sobre la MEC facilitándose la invasión de implantes endometriósicos, El mecanismo exacto aún no es bien definido.

Se han estudiado varias enzimas y factores responsables de conferir esta cualidad a la endometriosis. De tales estudios destacan los de Zhang y su grupo, quienes dieron un tratamiento a las células mesoteliales peritoneales con factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y ello permitió medir la adherencia de las células endometriales a las células mesoteliales del peritoneo; encontraron que se incrementaba con el tratamiento descrito. Sin embargo, la mayor parte de los estudios apunta a la investigación de enzimas metaloproteinasas de matriz que, en conjunto con sus factores inhibidores, parecen jugar un papel importante en la remodelación endometrial fisiológica que acompaña a la menstruación. En 1962 Gross y Lapière descubrieron el primer miembro de la familia de las metaloproteinasas e identificaron sus capacidades en varios procesos de remodelación. Las funciones de estas enzimas asociadas al cinc, para degradar varios componentes de la matriz extracelular, como colágenos intersticiales, fibronectina, colágeno tipo IV, laminina, elastina y otros proteoglicanos se ligaron al principio a las capacidades de invasividad de las células tumorales y, posteriormente, se observaron en varias estirpes celulares. Más tarde se detectó el ARN mensajero (ARNm) de los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP) 1 y 2, entre los días 4 a 26, a pesar de que no hay concentraciones detectables de ARNm de las proMMP-1 o 3, por lo que se establece una asociación de estas enzimas con el tejido endometrial y con la fisiología de la menstruación. Aunque en varios estudios se ha apoyado la influencia de la progesterona como inhibidor de la expresión de metaloproteinasas, también se ha observado que antes del aumento de la progesterona en la fase lútea las concentraciones de estas enzimas bajan a niveles indetectables (Figura 9) <sup>41</sup>

Kokorine y su grupo determinaron la expresión del ARNm de la metaloproteinasa-1 en focos de endometriosis en el ovario y en el peritoneo (lesiones rojas) y encontraron relación entre la expresión de ésta, la ausencia de receptores de progesterona y el color de las lesiones (lo que denota actividad inflamatoria).

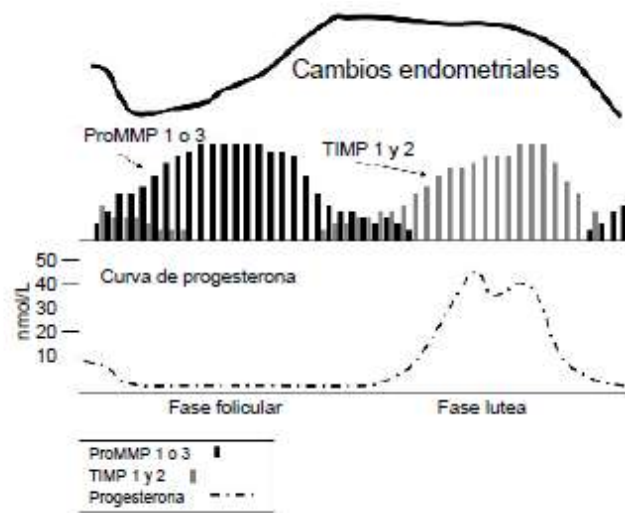


Figura No. 9 . Representación esquemática de la asociación entre los cambios endometriales cíclicos normales y las concentraciones de progesterona en relación con la expresión del ARNm de promotores de las metaloproteinasas (ProMMP) y los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP). Fuente: referencia No, 1

La MMP-3 se ha señalado como un copartícipe en el proceso de invasión de la endometriosis, al igual que las MMP 2, 9 y la metaloproteinasa de membrana tipo 1. Junto a estas enzimas se ha encontrado un supresor de apoptosis cuya expresión aumenta a la par con estas metaloproteinasas: la survivina. Las variaciones en la expresión de TIMP también se han determinado, junto con otras enzimas en diferentes localizaciones de focos endometriósicos; la TIMP-2 es la más relevante. En un modelo experimental con ratones atímicos se suprimió el desarrollo de implantes endometriósicos con un pretratamiento de progesterona o TIMP, lo contrario sucedió al administrar estrógenos. Se dispone de suficientes demostraciones para apoyar el papel de la progesterona en la regulación de la expresión de metaloproteinasas endometriales. Se han investigado varios factores que, junto con la progesterona o de manera independiente pudieran influir en la expresión de las metaloproteinasas. Los casos de menstruaciones con patrones irregulares consecutivos a terapia hormonal se han asociado con la fluctuación de las concentraciones de metaloproteinasas y de sus inhibidores. El factor de

crecimiento b (TGF-b) mide, específicamente, la supresión generada por la progesterona de las metaloproteinasas; por tanto, al utilizar el modelo de los ratones atímicos se encontró que al bloquear la acción de TGF-b, el esteroide sexual no puede prevenir el desarrollo de endometriosis experimental. También se vio que la actividad sostenida de TGF-b no mantiene una supresión constante de las MMP. Se observó, específicamente, que este factor regula sobre todo a MMP-3 y 7. Se han efectuado estudios con anticuerpos dirigidos a TGF-b que abolen su acción supresora, lo cual concuerda con las altas concentraciones de TGF-b en el líquido peritoneal. Otro factor que regula la expresión de metaloproteinasas es la interleucina-1 $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ), una citocina que demuestra la relación entre endometriosis y factores inmunológicos. Esta citocina es un estimulador de MMP-3 y quizá MMP-7 que puede oponerse a la supresión de progesterona sobre las metaloproteinasas. Está demostrado que la exposición a la progesterona reduce la estimulación de IL-1  $\alpha$ , por lo que un antiprogestágeno como la onapristona puede impedir la supresión generada por la progesterona. Otros estudios que apoyan la participación de IL-1 han visto aumentada su expresión en la endometriosis avanzada, particularmente el subtipo a junto con el receptor de IL-1 sRII. Otros factores estudiados son la interleucina 1 b (IL-1 $\beta$ ) que afecta las concentraciones de MMP-1, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que estimula la secreción de MMP-1 y 3. También se ha promovido la participación de la MMP-9/TIMP-1, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el inductor de metaloproteinasas de la matriz extracelular (EMMPRIN)<sup>39,41,50</sup>.

Desde la perspectiva genética se han estudiado polimorfismos en la región promotora de los genes de la MMP-1 y 3 en mujeres con endometriosis pero su significado es incierto debido a que su frecuencia y asociación en diferentes poblaciones como la italiana y la china, arrojan resultados distintos <sup>42</sup>

Es importante recalcar que no existe evidencia clínica de mayor prevalencia de endometriosis en pacientes inmunosuprimidas. Existen muchas evidencias de la activación de macrófagos peritoneales con incremento en la producción de citocinas en mujeres con endometriosis, acompañada de una disminución de la

actividad fagocítica. Sharpe-Timms y colaboradores encontraron una proteína la cual llamaron Endo-I en el epitelio endometriósico, proteína la cual no es observada en el epitelio endometrial eutópico. Esta proteína Endo-I es estructuralmente similar a una haptoglobina. Se ha observado esta proteína muy relacionada con los macrófagos peritoneales, incrementando su producción de Interleucina 6 (IL-6), así mismo reduciendo la fagocitosis de los macrófagos bloqueando la capacidad de adherencia. Además se encontró que la IL-6 regula la producción de Endo-I.

Además de esto se tiene evidencia de compromiso con la actividad de las células Natural-Killer en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis ocasionando esto una disminución en la vigilancia inmunológica de tejidos ectópicos. Sin embargo los resultados de estudios son inconstantes acerca de la disminución en la actividad de las NK. Esta disminución en la actividad de las NK también se ha visto más relacionada en estadios de endometriosis moderada y severa.

En cuanto a los linfocitos, desde hace más de 25 años Dmowski y colaboradores demostraron que la inmunidad de los linfocitos T en monos Rhesus con endometriosis espontánea se encuentra suprimida. En mujeres con endometriosis se conoce que hay gran concentración de citocinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos derivado de las propias lesiones de la enfermedad, secretados por macrófagos y otras células inmunes. Las lesiones endometriósicas secretan muchas sustancias proinflamatorias como IL-1, IL-8, factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , (TNF-  $\alpha$ ) e Interferón- $\gamma$ , los cuales actúan como factores quimiotácticos para el reclutamiento de macrófagos y Linfocitos T hacia el peritoneo. Existe un potente quimioattractor de linfocitos T y monocitos llamado RANTES (por sus siglas en inglés Regulated on Activation Normal T Exposed and Secreted). Este factor quimiotáctico se encuentra incrementado en el fluido peritoneal en la endometriosis y se correlaciona con el grado de severidad de la enfermedad. La concentración del quimiotáctico de los monolitos, la proteína-1, también se encuentra aumentada<sup>33,43</sup>

## **MACROFAGOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGENIA DE LA ENDOMETRIOSIS**

La evolución de la endometriosis requiere de la participación de varios sistemas y factores, la angiogénesis, el reclutamiento y la proliferación se conjugan en un flujo continuo de sucesos que facilitan la supervivencia y evolución de las células endometriósicas. Ésta es una enfermedad crónica inflamatoria en la que hay secreción elevada de citocinas proinflamatorias, neoangiogénesis, reflujo endometrial y función autoinmunitaria deteriorada<sup>44,46</sup>

Los macrófagos constituyen el 85% de las células en el líquido peritoneal, el 15% restante lo constituyen otras líneas celulares como linfocitos. El líquido peritoneal está preparado para defenderse ante la agresión, La concentración de macrófagos varía durante el ciclo menstrual, y son esenciales para limpiar la cavidad peritoneal de restos celulares, viejos espermatozoides y células foliculares. Los macrófagos cuentan con sistemas que intervienen en la formación de citosinas, con la fagocitosis y la citotoxicidad, que va a depender de su grado de activación. Los macrófagos peritoneales tienen una alta actividad enzimática más alta que los monocitos séricos, Los niveles de activación varían durante el ciclo menstrual

Muchas de las citocinas y los factores secretados por las células que ocasionan la reacción inflamatoria generan sus signos y síntomas típicos, como: dismenorrea, dispareunia, dolor pélvico crónico, formación de adherencias y cicatrices, que conducen al estado de infertilidad. Estos factores contribuirían a un ambiente no propicio para la foliculogénesis, fertilización e implantación del embrión. Un microambiente peritoneal anormal con aumento de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y IL-8) condiciona la implantación y el crecimiento de tejido endometrial “regurgitado”.

El aumento de las citocinas se relaciona con la cantidad, concentración y activación de los macrófagos peritoneales, que podría deberse a un proceso inflamatorio secundario a tejido endometrial y otros restos tisulares en el peritoneo; sin embargo, este estado en el que se eleva la actividad de los macrófagos

predispone a la enfermedad, lo que se demuestra por la sobreproducción de IL-6 y 8 en los monocitos de pacientes que la padecen. Los macrófagos facilitan la evolución de la endometriosis por aumento en la liberación de factores y citocinas promotoras del crecimiento en combinación con una acción de limpieza afectada. Los macrófagos peritoneales expresan receptores limpiadores clase A que utilizan calcio para mediar su adhesión independiente, al examinar en estudios *in vitro* los macrófagos de pacientes con endometriosis, se encontró que expresan bajas concentraciones de estos receptores *in situ* pero su adherencia se incrementa *in vitro* luego de una regulación postranscripcional, lo que explicaría la ausencia de interacción con la matriz extracelular.

Según su actividad existen dos subclases de macrófagos: los activados M1, potentes células efectoras que matan microorganismos y células tumorales al producir grandes cantidades de citocinas, y los M2, que controlan la reacción inflamatoria, promueven angiogénesis y modulan la inmunidad de las células T ayudadoras-1. Un desequilibrio entre estas dos subclases facilitaría la evolución de la endometriosis peritoneal. Los factores y citocinas secretadas por los macrófagos promueven el crecimiento y la supervivencia de los focos endometriósicos; además, el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis estimula la proliferación de células cultivadas del estroma endometrial; con base en estudios recientes de los receptores estrogénicos en los macrófagos que responden a estos esteroides, se estima que podrían modular la función inmunitaria de estas células, incluso se ha determinado la existencia de receptores de progesterona y su relación con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que se elevan con estrógenos y disminuyen con progesterona, por lo que este factor de crecimiento se reduce cuando se trata con tamoxifeno. El HGF y los estrógenos parecen favorecer el crecimiento de las células endometriósicas<sup>46, 52</sup>

### *Células asesinas naturales*

Cuando se empezaron a estudiar estos componentes de la reacción inmunitaria había varias observaciones inconsistentes respecto a las cantidades de células asesinas naturales (NK) dentro del líquido peritoneal de pacientes con

endometriosis, pero la disminución de su actividad citotóxica siempre fue consistente, hallazgo aún más pronunciado si además los pacientes se encontraban en estadios graves de la enfermedad, por lo que este problema es de tipo cualitativo. Lo que sugiere una función citolítica y de limpieza de las células NK, que cuando se afecta junto con la de los macrófagos, permite la implantación y evolución de focos endometriósicos. La disminución de la actividad de estas células puede relacionarse con la reacción inflamatoria del tejido endometriósico, y varios factores provenientes de los macrófagos generarían una modulación secundaria de las células NK, pues se ha visto que el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis puede suprimir la citotoxicidad de las células NK en pacientes sanos<sup>41,46</sup>.

### *Linfocitos*

En sus estudios con monos *Rhesus* afectados por endometriosis, Dmowski y su grupo demostraron deficiencia inmunitaria mediada por linfocitos T y, en mujeres con la enfermedad, que la actividad citotóxica de los linfocitos en sangre periférica contra las células endometriales está deteriorada. Estos defectos en la actividad citotóxica contra las células endometriales dentro de la cavidad peritoneal serían un factor importante en la evolución de la endometriosis, la CD54, una molécula de adhesión celular de los mecanismos citotóxicos, que está significativamente reducida en las células endometriales de mujeres con endometriosis, ocasionaría un déficit en la adhesión de los efectores inmunológicos a las células endometriales. En caso de endometriosis, las concentraciones de linfocitos T en el líquido peritoneal están aumentadas y no existe cambio significativo en las relaciones de linfocitos cooperadores y supresores al comparar los resultados de las pacientes afectadas con los del grupo control.

### *Citocinas*

Debido a la gran complejidad en la evolución de un proceso inflamatorio, las funciones de varias de las citocinas que participan en la endometriosis se han

descrito en relación con los diversos factores y células que estimulan. Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular implicadas en la regulación de las actividades celulares, fungen como mensajeros paracrinos y autócrinos dentro del sistema inmunitario y modulan su interacción con otros sistemas. Las acciones de las citocinas dependen de su interacción con sus receptores específicos y al parecer promueven la implantación y el crecimiento del endometrio ectópico al inducir su proliferación y angiogénesis. Entre las citocinas relacionadas con la evolución de la endometriosis están: IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18, TNF- $\alpha$ , VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) y RANTES (factor expresado y liberado en células T normales y regulado al activarse). Varias citocinas y factores de crecimiento están elevados en el medio peritoneal de pacientes con endometriosis y parecen tener una función importante en su evolución<sup>40, 41</sup>

### *Prostaglandinas*

Las prostaglandinas son lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico, su relación con la dismenorrea es obvia, pues se han demostrado concentraciones elevadas de PGE2 en el flujo menstrual de pacientes dismenorreicas; en la endometriosis los macrófagos y la liberación de las prostaglandinas están aumentados, y hay un grado mayor de inmunomarcaje para COX-2 (ciclooxigenasa-2, la enzima responsable de la producción de prostaglandinas) en el epitelio endometrial de pacientes con la enfermedad.

Además, como la PGE2 es un potente inductor de la aromatasa en células del estroma endometrial, contribuye a la evolución de endometriosis. Las prostaglandinas también promueven la transcripción de factores angiogénicos como el VEGF y otras angioproteínas, y el VEGF promueve la expresión de metaloproteinasas (MMP) en el endometrio



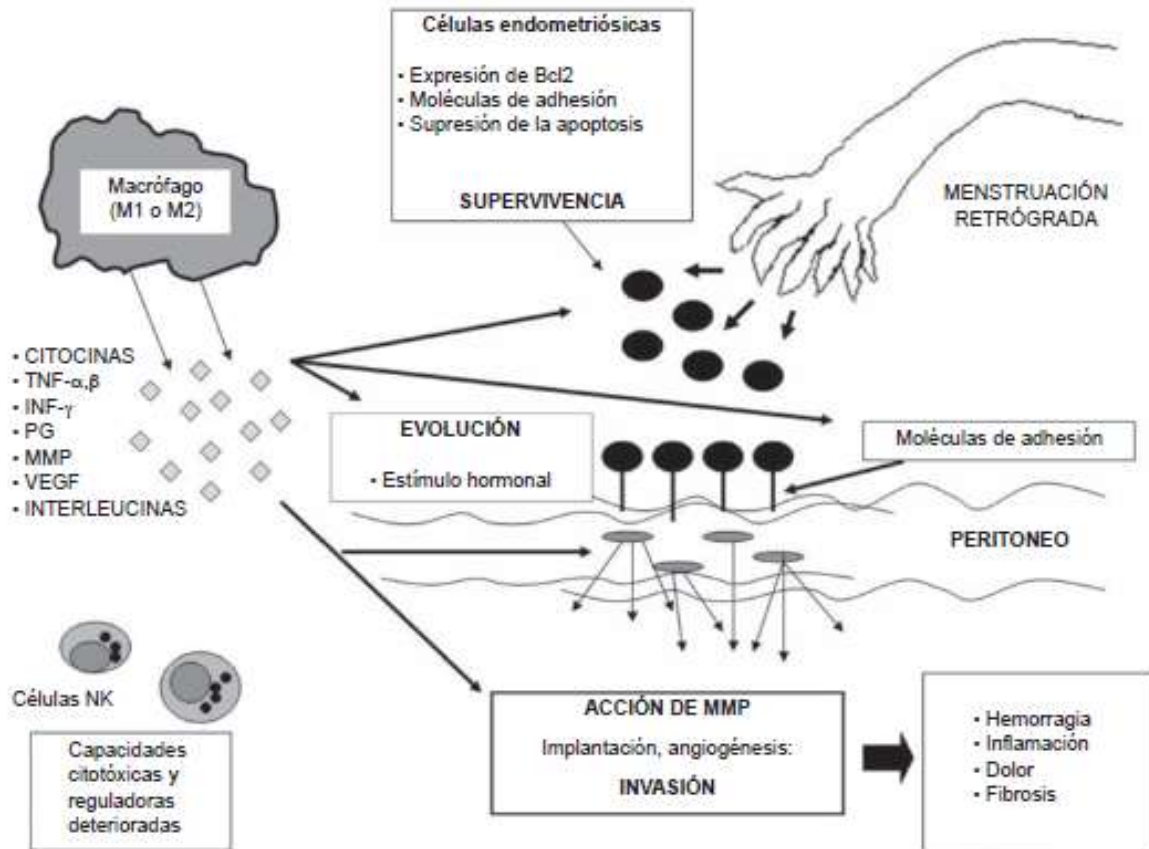


Figura No. 10 Esquema básico de los factores que participan en las cinco fases de la patogénesis de la endometriosis. Las células endometriósicas, mediante la menstruación retrógrada, llegan al peritoneo, en donde una serie de factores les facilita la supervivencia y, con ayuda de las moléculas de adhesión, estímulo hormonal y la acción de las metaloproteinasas (MMP), logran adherirse e iniciar su proceso de invasión. Los macrófagos secretan una gama de citocinas que promueven estos procesos. Fuente: referencia No, 50

### *Ambiente peritoneal*

El peritoneo es una suave membrana serosa que recubre el interior de la pared abdominal. La cavidad peritoneal está habitualmente vacía, con la excepción de una pequeña capa de líquido que mantiene la humedad en la superficie. En las mujeres esta cavidad está indirectamente en contacto con el exterior a través de las trompas de Falopio. El volumen de líquido peritoneal está en relación con el ciclo menstrual, aumentando desde 0.8ml en la fase proliferativa temprana, hasta un valor medio de 18.7ml tras la ovulación para descender de nuevo a un valor medio de 5.4ml en la fase secretora tardía.

El líquido peritoneal se origina principalmente como una exudación del ovario, causada por permeabilidad vascular incrementada, con variación cíclica en volumen y hormonas esteroides, las que siempre son mayores que en el plasma. Contiene grandes cantidades de macrófagos y sus productos de secreción, y tiene una gran área de intercambio con el plasma por medio del peritoneo, el que es muy permeable a las moléculas pequeñas. La endometriosis se asocia con inflamación estéril de grado bajo, mayores concentraciones de macrófagos activados y de muchas de sus secreciones, tales como citoquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos. Las concentraciones de CA-125 y de glicodelinas también están incrementadas, las que son segregadas localmente por las células endometriales. La función de la célula asesina natural (NK) declina, posiblemente mediada por glicodelinas o descamación local de molécula de adherencia intercelular (ICAM)-1. El ovario es también un microambiente específico, con concentraciones de hormonas esteroides 1000 veces mayores en los folículos que en el plasma. Las células endometriales superficialmente implantadas influyen en las concentraciones de líquido peritoneal, de manera que es el ambiente local, más que las diferencias celulares inherentes, lo que podría explicar las diferencias entre la endometriosis superficial y el endometrio eutópico. Los implantes endometriales superficiales son regulados por factores del líquido peritoneal, mientras que la endometriosis profunda y la endometriosis ovárica quística son influenciadas por factores sanguíneos y/u ováricos. El tipo de lesión celular, los ambientes hereditario e inmunológico y las concentraciones hormonales locales en el ovario y el líquido peritoneal, decidirán la expresión como endometriosis ovárica quística, endometriosis profunda o adenomiosis externa, y si lo último se asocia con adherencias.

Las inhibinas A y B y la activina A son factores de crecimiento que juegan roles autocrino/paracrino locales en los tejidos reproductivos. El tejido peritoneal y las Células endometriósicas cultivadas expresan receptores mRNA de inhibina  $\alpha$ -, activina  $\beta A$ -, de subunidades  $\beta B$  y de activina. En mujeres sanas, las concentraciones de inhibina A y B y de activina A en líquido peritoneal son significativamente mayores que en el suero ( $P < 0,001$ ), en ambas fases del ciclo.

El líquido folicular de mujeres con endometriosis induce mayor proliferación celular que el líquido folicular de mujeres sin endometriosis ( $P < 0,05$ ), lo que puede indicar que el contenido del líquido folicular puede contribuir a promover los factores de crecimiento en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis.<sup>53</sup>

## **PROPORCIÓN DE MACRÓFAGOS ASOCIADOS AL DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRIOSIS**

La circulación del líquido peritoneal, su capacidad de compartimentalización y su alta concentración de células involucradas en el proceso inflamatorio y respuesta inmune, describen su capacidad defensiva. Destaca la concentración incrementada de macrófagos y factores quimiotácticos que actúan sobre estas células y sobre linfocitos T.

La consecuencia directa de una población aumentada de macrófagos conlleva a un incremento de todos los factores secretados por los mismos, y por lo tanto a la orquestación de factores que deberían disminuir las posibilidades de implantación de cualquier célula a este medio, mas sin embargo, la presencia de restos menstruales en el peritoneo pueden ser consecuencia de una respuesta inmune defectuosa, lo cual predispone el desarrollo de la endometriosis, por otro lado la acumulación de macrófagos en lesiones endometriósicas mantienen un proceso inflamatorio crónico, secretando factores mitogénicos y angiogénicos, agregando la citotoxicidad comprometida de linfocitos y células asesinas naturales (NK) en su reacción contra células endometriales.

Los factores quimiotácticos aumentados en la endometriosis son clave para el proceso inflamatorio, que actúan sobre monocitos, células NK, linfocitos T y eosinófilos, propagando el reclutamiento de factores inflamatorios y promoviendo la endometriosis.

Los factores y citocinas secretadas por los macrófagos promueven el crecimiento y la supervivencia de los focos endometriósicos; además, el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis estimula la proliferación de células del estroma endometrial <sup>53</sup>

## **GRADO DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES EN MACRÓFAGOS QUE SE ASOCIEN AL DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRIOSIS**

El aumento de las citocinas se relaciona con la cantidad, concentración y el grado de expresión de los macrófagos peritoneales, que podría deberse a un proceso inflamatorio secundario a tejido endometrial y otros restos tisulares en el peritoneo; sin embargo, este estado en el que se eleva la actividad de los macrófagos predispone a la enfermedad, lo que se demuestra por la sobreproducción de IL-6 y 8 en los monocitos de pacientes que la padecen.

Según su actividad existen dos subclases de macrófagos: los activados M1, potentes células efectoras que matan microorganismos y células tumorales al producir grandes cantidades de citocinas, y los M2, que controlan la reacción inflamatoria, promueven angiogénesis y modulan la inmunidad de las células T ayudadoras-1. Un desequilibrio entre estas dos subclases facilitaría la evolución de la endometriosis peritoneal.

Se ha encontrado que los signos y síntomas expresados por pacientes con endometriosis diagnosticada por laparoscopia (es decir, confirmada), tienen una relación directa con la concentración a nivel peritoneal de TNF-a, mieloperoxidasa y TREM-1 activadas, esta población celular corresponde a macrófagos y es útil para diferenciar entre pacientes con y sin endometriosis, y existe una relación con el grado de invasión intraperitoneal y su sintomatología.

De todas las células que componen el infiltrado en el peritoneo de mujeres con endometriosis, los macrófagos son candidatos celulares decisivos para iniciar el establecimiento definitivo de las lesiones endometriósicas, además de generar el daño al tejido que facilitará la clínica de la enfermedad, con la secreción de TNF-a, VEGF y PGE2 que perpetuaría la presencia del tejido ectópico en peritoneo <sup>50,53</sup>

## CONCLUSIONES

- Diversos Factores inmunológicos juegan un rol particular en la génesis y el desarrollo de la endometriosis
- La creación de un ambiente inmunotolerante y proinflamatorio podría explicar la aparición de los síntomas más importantes: la infertilidad y el dolor crónico
- En sangre periférica de pacientes con endometriosis se aprecia un número de monocitos normales, pero su estado de activación es mayor
- A nivel peritoneal los macrófagos están aumentados en número, concentración y estado de activación, lo que provoca una mayor generación de citocinas y factores de crecimiento que producen el microambiente adecuado para esta enfermedad, determinando la proliferación en implantación a nivel peritoneal del tejido endometrial
- Participan en la remodelación de los implantes a través de la secreción de factor de necrosis tumoral, el cual regula la secreción de metaloproteinasas de matriz
- Los macrófagos estimulan la angiogénesis en los focos endometriósicos lo que permite la supervivencia y el crecimiento del foco endometriósico
- El aumento de citocinas promueve un microambiente peritoneal anormal, los macrófagos se deterioran con dichos factores y, paradójicamente, parecen estimular la formación de tejido endometriósico en lugar de eliminarlo como ajeno al entorno.
- Los macrófagos parecen tener menor cantidad de receptores para realizar su acción citotóxica, y se han observado receptores estrogénicos en ellos.
- Los monocitos periféricos y los macrófagos peritoneales están activados y producen mayor secreción de citoquinas, factores de crecimiento y prostaglandinas, los cuales son responsables de la sintomatología de la enfermedad

- Los macrófagos están comprometidos en la fagocitosis y, por medio de sus productos secretorios, en las reacciones inflamatorias. Constituyen el tipo celular dominante en la población celular del líquido peritoneal
- Al ser estimulados, producen factores que estimulan la proliferación de monocitos en la médula ósea, los que migran a la cavidad peritoneal como macrófagos activados, para tomar parte en la respuesta inflamatoria y los mecanismos de defensa.
- La adherencia del endometrio regurgitado puede ser mediada por moléculas de adherencia y factores solubles producidos por los macrófagos peritoneales en estado avanzado de diferenciación
- El endometrio ectópico es más resistente a la lisis mediada inmunológicamente y demuestra menos apoptosis que el endometrio eutópico
- Mientras en la mujer sin endometriosis las células inmunes regulan la proliferación celular endometrial al principio del ciclo y la apoptosis al final del ciclo, en la endometriosis el proceso alterado de señales inmunológicas por la célula endometrial provoca su proliferación continua, reacción inflamatoria y disminución de la apoptosis que, fuera del útero, sobrevive, se implanta y da origen a la endometriosis. Así, el reflujo menstrual crece en la superficie peritoneal
- La citometría de flujo se utiliza para analizar y separar células según características definidas mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos para moléculas de superficie que hacen posible la definición y estudio de subpoblaciones celulares
- La mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia, ya sea intrínseca o extrínseca con una con anticuerpos poli y monoclonales capaces de detectar antígenos asociados con el linaje celular
- Se sabe que los macrófagos peritoneales tienen un inmunofenotipo característico (CD14+TREM-1+Mieloperoxidasa+TNF-a+) por lo que el análisis mediante citometría de flujo ofrece una forma muy específica en la

separación de componentes de tipo subcelulares o en subpoblaciones ofreciendo una medición cuantitativa y multiparamétrica de los grupos celulares bastante precisa, pudiendo correlacionar la fisiopatología de la endometriosis mediada por macrófagos en la clínica de la enfermedad.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Ayala YR, Mota GM. Endometriosis: fisiopatología y líneas de investigación (primera parte), Ginecol Obstet Mex. 2007; 75(8) 477- 83.
- 2.- Velebil P, Wingo PA et.al. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive age women in the United States. Obstet Gynecol. 1995; 86(5): 764-9.
- 3.- Ezkenazi B, Warner MLL, Epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am. 1997; 24(2): 235-58.
- 4.- Jameson JL, De Groot LJ. Endocrinology, Adult and Pediatric. 6a ed. Vol II. Saunders Elsevier, EE.UU. 2010. 2356- 2366.
- 5.- Hernández QT, Hernández VM, et.al ,Endometriosis ¿es un problema de señales inmunológicas?. Ginecol Obstet Mex 2005;73:492-9
- 6.- Hernández GC, Vadillo OF. El líquido peritoneal de mujeres con endometriosis promueve la adhesión celular, modelo in vivo. Perinatol Reprod Human, 2002; 16: 163-171.
- 7.- Tran LV, Tokushige N, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Macrophages and the nerve fibers in peritoneal endometriosis. Hum Reprod. 2009; 24:835-41.
- 8.- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol 1927;54:174-7.

9.- Ochoa MG, Posada VN, et.al. Guías de práctica clínica basadas en evidencia. Endometriosis. Asociación Colombiana de facultades de Medicina ASCOFAME, 1:41

10.- Baeriswyl E, Glavic N. Inmunología de la endometriosis. Rev. chil. obstet. ginecol. v.67 n.5 2002; 67(5): 421-426

11.- Meyer R. Uber den Stande der frage der Adenomyositis und adenomyome in allgemeinen un insbesondere uber adenomyositis seroepithelialis und andenomyometiritis sacromatosa. Zentrab Gynakol 1919; 36:745.

12.- Paul J.Q. van der Linden. Theories on the pathogenesis of endometriosis. Human Reproduction 1996;11: 53.65.

13- Halban J (1924) Hysteroadenosis metastatica. Wein Klin Wsch 1924; 37: 1205-6.

14.- Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C. ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Hum Reprod 2005;20: 2698-2704.

15.- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997;67:817-21.

16.- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). The investigation and management of endometriosis. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) 2006. Greentop-guideline; No. 4, Oct:1-14.

- 17.- Brosens I, Puttemans P, Campo R, Gordts S, Brosens J. Non-invasive methods of diagnosis of endometriosis; *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15(6):519-22.
- 18.- Mettler L, Schollmeyer T, Lechmann-Willenbrock, Schüppler U, Schmutzler A, Shukla D, Zavala A, Lewin A. Accuracy of Laparoscopic Diagnosis of Endometriosis, *JSLs*; 2003,7:15-18.
- 19.- Ballard K, Seaman H, de Vries C, Wright J. Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study. Part 1. *Br J Obstet Gynaecol* 2008;115:1382-91.
- 20.- Seaman H, Ballard K, Wright J, de Vries C. Endometriosis and its co-existence with irritable bowel syndrome and pelvic inflammatory disease: findings from a national case-control study. Part 2. *Br J Obstet Gynaecol*. 2008;115:1392-6.
- 21.- Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Daraï E. Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertil and Steril* 2009;92: 1825- 33.
- 22.- Chapron C, Querleu D, Bruhat M, Madelenat P, Fernandez H, Pierre F, Dubuisson JB. Surgical complications of diagnostic and operative gynaecological laparoscopy: a series of 29,966 cases. *Hum Reprod*. 1998; 13:867-72.
- 23.- Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24:235-258.
- 24.- Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998;4:741-51.

- 25.- Koninckx PR, Renaer M, Brosens IA. Origin of peritoneal fluid in women: an ovarian exudation product. *Br. J. Obstet. Gynaecol* 1980; 87:177-83.
- 26.- Leiva MC, Hasty LA, Pfeifer S, Mastroianni L Jr, Lyttle CR. Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:592-8.
- 27.- Akoum A, Lemay A, Brunet C, Hébert J. Cytokine-induced secretion of monocyte chemotactic protein-1 by human endometriotic cells in culture. The Groupe d'investigation en Gynécologie. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:594-600.
- 28.- Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75:1-10.
- 29.- Olive DL, Montoya I, Riehl RM, Schenken RS. Macrophage-conditioned media enhance endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:953-8.
- 30.- Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1 $\alpha$ . *Mol Hum Reprod* 2000; 6:269-75.
- 31.- Lebovic DI, Chao VA, Martini JF, Taylor RN. IL-1 $\alpha$  induction of RANTES chemokine gene expression in endometriotic stromal cells depends on a nuclear factor  $\kappa$ B site in the proximal promoter. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4759-64.
- 32.- Lebovic DI, Chao VA, Taylor RN. Peritoneal Macrophages Induce RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene transcription in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 89:1397-401.

- 33.- Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;(67):817-21.
34. Peter O. Krutzik, Jonathan M. Irish, Garry P. Nolan. Omar Perez .Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical application.. *Clinical immunology*. 110 (2005) 206-221
35. Bonner, W, Hulett, H, Sweet R, Herzenberg. Fluorescence Activated Cell Sorting. *The Review of Scientific Instruments*, 201043(3): 404-409.
36. Crossland-Taylor, P.J. A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid through a Tube. *Nature*, 2008,171: 37-38.
37. Rieseberg M, Kasper C, Reardon K, Scheper T. Flow Cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. 56: 350-360.
38. Novella-Maestre E, Herraiz S, Vila-Vives JM Effect of antiangiogenic treatment on peritoneal endometriosis-associated nerve fibers. *Fertility and Sterility*. 2012. 1:9
40. Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Imbalance in cytokines from interleukin-1 family – role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68: 138–145
41. Wang X, Yu J, Luo X, et.al. The high level of RANTES in the ectopic milieu recruits macrophages and induces their tolerance in progression of endometriosis. *Journal of Molecular Endocrinology* (2010) 45, 291–299
42. Bokor A, Debrock S, Drijkoningen M, Goossens W,et.al. Quantity and quality of retrograde menstruation: a case control study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:123

42. Harada T, Taniguchi F, Izawa M, et.al. Apoptosis and endometriosis. *Frontiers in bioscience*. 2007, Vol 12. 3140:3151
43. Wu M, H.Sunny S, Chen-Chung L, et.al. Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Molecular Human Reproduction*. 2009. Vol.8, No.12 pp. 1103–1110
44. Lousse J-C, Defre S, Colette S, et.al. Expression of eicosanoid biosynthetic and catabolic enzymes in peritoneal endometriosis. *Human Reproduction*, 2010, Vol.25, No.3 pp. 734–741,
45. Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Human Reproduction Update* 2008, Vol. 2, No. 5 pp. 371–384
46. Lin Y-J, Lai M-D, Lei H-Y, et.al. Neutrophils and Macrophages Promote Angiogenesis in the Early Stage of Endometriosis in a Mouse Model. *Endocrinology*, March 2007, 147(3):1278–1286
47. Hornung D, Waite L, Ricke E, et.al. Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  Have Opposing Effects on Monocyte Chemotaxis in Endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011 Vol. 86 , No. 7. Pp. 3108- 3114
48. Hernández-Guerrero C. Badillio F, Jiménez L. et.al. El líquido peritoneal de mujeres con endometriosis promueve la adhesión celular. Modelo in vitro. *Perinatol Reprod Hum*, 2007, vol 16 No 14. Pp 163- 171
49. N. Contreras, J. Ponce, A. García-Tejedor, et.al. Clínica y diagnóstico de la endometriosis. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 2011;12(2):63-68

50. Yáñez R, González M. Endometriosis: physiopathology and investigation lines (part two). Ginecol Obstet Mex. 2007;76:549-57.

51. Hernández-Quijano T, Hernández M, Zárate A, et.al, Endometriosis: ¿es un problema de las señales inmunológicas?. Ginecol Obstet Mex. 2009 ;Vol 73:492-499

52. Martínez- Salazar G. González S, Hernández A. et.al. Patrón de expresión del receptor de estrógenos a y b en endometriosis experimental en la rata Wistar. Perinatol Reprod Hum 2007; 16: 172-179

53. Hoong- Nerng Ho, Ming- YihWu, Yu-Shih Yang. Peritoneal Cellular Inmuniy and endometriosis. American Journal of Reproductive Immunology, Volume 38, Number 6, 1 December 2007 , pp. 400-412

### Anexo I: Información relevante de los artículos incluidos en el estudio

Referencia	AUTORES	TAMAÑO DE LA MUESTRA	PRUEBA ESTADÍSTICA UTILIZADA	RESUTADOS OBTENIDOS
43	Meng-Hsing Wu, H.Sunny Sun, Chen-Chung Lin, Kuei-Yang Hsiao, Pei-Chin Chuang, Hsien-An Pan and Shaw-Jenq Tsai	49 casos confirmados de endometriosis por histopatología.	Duncan	Las concentraciones de PGF2 en el líquido peritoneal se asociaron con el avance de la endometriosis, con los niveles más altos se encuentran en estadios III y IV
44	J-C. Lousse, S. Defre`re, S. Colette, A. Van Langendonckt, and J. Donnez	40 pacientes con endometriosis confirmada	Mann-Whitney U	sPLA2-IIA, COX-2 y mPGES-1 mRNA fueron mayores en los macrófagos peritoneales de pacientes con
39	Justyna Sikora*, Aleksandra Mielczarek-Palacz, Zdzislawa Kondera-Anasz	El líquido peritoneal obtenido a partir de 85 mujeres con y sin endometriosis, entre 21 y 38 años .	Normalidad de la distribución: Shapiro-Wilk. Datos paramétricos: prueba T de Student Datos no paramétricos: Fisher. Correlaciones: Spearman	mayor secreción de IL-1beta por los macrófagos peritoneales y el ICE inferior IL-18 y en pacientes con endometriosis que en el control se observaron.
40	Xiao-Qiu Wang, Jing Yu, Xue-Zhen Luo, Ying-Li Shi, Yun Wang, Ling Wang and Da-Jin Li	20 pacientes con endometriosis confirmada por laparoscopia	ANOVA	RANTES pueden inducir la formación de fenotipo tolerante de los macrófagos cambiando el equilibrio entre la liberación de IL-10 y IL12p70



**Anexo I: Información relevante de los artículos incluidos en el estudio  
(continuación)**

Referencia	AUTORES	TAMAÑO DE LA MUESTRA	PRUEBA ESTADÍSTICA UTILIZADA	RESUTADOS OBTENIDOS
41	Attila Bokor, Sophie Debrock, Maria Drijkoningen, Willy Goossens, Vilmos Fülöp and Thomas D'Hooghe	107 mujeres con endometriosis (n = 59) y controles con una pelvis normal (n = 48) durante la fase luteal (n = 46), folicular (n = 38) o menstrual (n = 23) de fase el ciclo	Prueba Kolomogorov-Smirnov/Lilliefors y Shapiro-Análisis estadísticos: Mann-Whitney y Fisher.	análisis del líquido peritoneal durante la menstruación mostró un aumento de la concentración de leucocitos, eritrocitos (hematocrito (0,03 L / L vs 0,003 L / L, p = 0,01) y la hemoglobina (0,8 g / dl frente a 0,1 g / dL, p = 0,01).
47	Daniela hornung, leslie I. Waite, emily a. Ricke, frauke bentzien, Diethelm wallwiener, and robert n. Taylor	32 mujeres con endometriosis confirmada	Kruskal-Wallis y Mann Whitney	los inhibidores de la PPAR-a y activadores de PPAR-g vías son candidatos potenciales como nuevas terapias
48	César Hernández Guerrero. Felipe Badillio Ortega, Luis Jiménez Zamudio. Er.al	50 membranas amnióticas de placentas obtenidas por parto eutócico	Kruskal-Wallis	Se identifica un aumento en la capacidad de adhesión de las células de pacientes con endometriosis

**Anexo I: Información relevante de los artículos incluidos en el estudio  
(continuación)**

Referencia	AUTORES	TAMAÑO DE LA MUESTRA	PRUEBA ESTADÍSTICA UTILIZADA	RESUTADOS OBTENIDOS
52	Guadalupe martínez-salazar, susana gonzález-gallardo. Antonia hernández-miranda, et.al	16 ratas hembras tipo Wistar,	ANOVA y Turkey	No existe diferencia en el patrón de expresión de los REay b entre el tejido endometriósico y el control
38	Edurne Novella-Maestre, Sonia Herraiz, Jose María Vila-Vives, Carmen Carda, Amparo Ruiz-Sauri. Antonio Pellicer	16 Ratones ovacteriomizados	Kruskal-Wallis Whitney y Dunn´s.	El número de macrófagos y los mastocitos disminuyen en el grupo tratado con Cb2 en comparación con los controles.
46	Yiu-Jiuan Lin, Ming-Derg Lai, Huan-Yao Lei, and Lih-Yuh C. Wing	30 ratones hembras C57BL/6NCrj	ANOVA y test de Tukey.	Los estrógenos estimulan la proliferación celular en tejido similar al del endometrio principalmente después de que el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en los sitios implantados.

**Anexo I: Información relevante de los artículos incluidos en el estudio  
(continuación)**

Referencia	AUTORES	TAMAÑO DE LA MUESTRA	PRUEBA ESTADÍSTICA UTILIZADA	RESUTADOS OBTENIDOS
34	Peter O. Krutzik, Jonathan M. Irish, Garry P. Nolan. Omar Perez	Artículo de revisión		La citometría de flujo hace mediciones cuantitativas y multiparamétricas para definir las propiedades de una población celular
35	Bonner, W. A.; Hulett, H.R.; Sweet, R.G. y Herzenberg,	Artículo de revisión		El aparato de FACS va acompañado por una computadora que produce un histograma de dos parámetros
36	Crossland-Taylor, P.J.	Artículo de revisión		Además del análisis de poblaciones celulares específicas, el FACS puede medir un gran número de parámetros celulares
37	Rieseberg, M.; Kasper, C.; Reardon, K.F. y Scheper T	Artículo de revisión		La mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia.

**Anexo I: Información relevante de los artículos incluidos en el estudio  
(continuación)**

Referencia	AUTORES	TAMAÑO DE LA MUESTRA	PRUEBA ESTADÍSTICA UTILIZADA	RESUTADOS OBTENIDOS
42	Tasuku Harada, Fuminori Taniguchi, Masao Izawa, Yoko Ohama...	Artículo de revisión		La Manipulación de los procesos de apoptosis podría utilizarse para tratar la endometriosis.
45	D.Vinatier <sup>1,3</sup> , P.Dufour <sup>1</sup> and D.Oosterlynck <sup>2</sup>	Artículo de revisión		Macrófagos peritoneales son citotóxicos hacia células endometriales
49	Nayanar Contreras, Jordi Ponce, Amparo García-Tejedor, et.al	Artículo de revisión		Factor de Necrosis Tumoral se puede utilizar para distinguir pacientes con o sin endometriosis
50	Rodrigo ayala yáñez,* manuel mota gonzález**	Artículo de revisión		La endmetriosis de desarrolla a partir de un proceso inflamatorio en el que participan citocinas, macrófagos, células NK, linfocitos y prostaglandinas con funciones alteradas

**Anexo I: Información relevante de los artículos incluidos en el estudio  
(continuación)**

Referencia	AUTORES	TAMAÑO DE LA MUESTRA	PRUEBA ESTADÍSTICA UTILIZADA	RESUTADOS OBTENIDOS
51	Tomás hernández quijano,* marcelino hernández valencia,* arturo zárate treviño,*	Artículo de revisión		Es inobjetable clínica y molecularmente la influencia endocrina sobre la endometriosis
53	Hoong- Nerng Ho, Ming- YihWu, Yu-Shih Yang	Artículo de revisión		macragos son activados por el reflujo del sangrado menstrual, los anticuerpos humorales y locales endometriales son detectados en pacientes con endometriosis.