

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11204 21

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES
Instituto Nacional de Perinatología
Subdirección de Biología de la Reproducción



"ALTERACIONES INMUNOLOGICAS EN ENDOMETRIOSIS
INMUNIDAD CELULAR EN EL MICROAMBIENTE
PERITONEAL"

Ernesto
DR. ERNESTO CASTELAZO MORALES
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

Que presenta para obtener el grado de subespecialidad en
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION EL

DR. JOSE MARIA MOJARRA ESTRADA

ASESOR: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:

DR. ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEHOS MENA



IN Per

México, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DR. ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEHOS M.
PROFESOR TITULAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

**A mi padre, a quien debo mi formación y mi carrera.
Enseñandome la honestidad y rectitud.
Brindandome sus consejos y enseñanzas.**

**A mi madre y a mis hermanas
por su comprensión, afecto y cariño.**

A Mónica, quien día a día me ha esperado y escuchado, dandome palabras de aliento y apoyo para seguir superandome. Quien ha estado conmigo en todo momento. Siempre con su amor, cariño y comprensión.

Al Instituto Nacional de Perinatología

A todos mis profesores

**Al Dr. Felipe Vadillo Ortega, al Q.F.B. César Hernández Guerrero
y al Dr. Antonio Espinosa de los Monteros Mena,
por su asesoría en la realización de esta tesis**

A mis compañeros

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS	2
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
IV. JUSTIFICACION	8
V. HIPOTESIS	9
VI. OBJETIVOS	10
VII. MATERIAL Y METODOS	11
VIII. RESULTADOS	15
IX. DISCUSION	17
X. TABLAS Y GRAFICAS.	19
XI. CONCLUSIONES.	48
XII. BIBLIOGRAFIA	49

I. INTRODUCCION

En los últimos años han surgido múltiples teorías que tratan de explicar la fisiopatogenia de la endometriosis. El porque en algunas mujeres se implanta el endometrio en la cavidad peritoneal y en otras no, parece tener relación con la actividad del sistema inmunológico que juega un papel determinante en este proceso, por lo que éste ha sido tópico de numerosas investigaciones a nivel mundial, sin embargo los resultados siguen siendo divergentes y en muchas ocasiones no concluyentes.

En este estudio se estudiaron pacientes con esterilidad y endometriosis, en comparación con un grupo control de pacientes con esterilidad sin endometriosis. Se cuantificaron y compararon subpoblaciones celulares de linfocitos T totales, B totales, cooperadores, supresores, T activados y natural killer en líquido peritoneal y en sangre periférica. Además se llevó a cabo un estudio para valorar la actividad inmunosupresora de la sangre periférica y el líquido peritoneal de pacientes con y sin endometriosis, en un ensayo de inducción de mitogénesis inespecífica in vitro con concanavalina A.

II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS

La endometriosis es una enfermedad con etiología e histogénesis desconocida. La enfermedad se caracteriza por crecimiento ectópico de glándulas endometriales y estroma fuera de la cavidad endometrial, la hipótesis más aceptada es la propuesta por Sampson, la cual señala como mecanismo causal el reflujo de sangre y endometrio descarnado a través de las trompas de falopio a la cavidad peritoneal (1). De acuerdo a esta hipótesis estas células deben ser capaces de invadir e implantarse en la superficie peritoneal y responder a los cambios hormonales cíclicos como lo hace el endometrio eutópico. Se han propuesto otras teorías como la diseminación linfática y hematogéna de los implantes endometriales, la diseminación iatrogéna del endometrio durante alguna cirugía que invada la cavidad endometrial y la metaplasia celómica como los casos reportados del desarrollo de endometriosis en hombres que estuvieron bajo tratamiento con compuestos estrogénicos.

Sin embargo en los últimos años ha surgido una oleada importante de investigaciones acerca de la relación entre la endometriosis y el sistema inmunológico. En cuanto a la respuesta inmune celular, Hill utilizando anticuerpos monoclonales inició la caracterización de subpoblaciones de leucocitos en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, en donde encontró aumento de leucocitos totales, macrófagos, cooperadores y natural killer en pacientes con endometriosis, encontrando el microambiente peritoneal inclinado hacia la inmunosupresión como lo indicó la relación alterada entre los linfocitos T cooperadores y los supresores (2). Oosterlynck y cols, encontraron disminución en la citotoxicidad de los leucocitos natural killer (NK) a el endometrio autólogo de pacientes con endometriosis (3). Viganò y cols. han relacionado el defecto en la citotoxicidad de los leucocitos de pacientes con endometriosis con la expresión de moléculas de superficie HLA I, las cuales mandan una señal negativa para la lisis mediada por células NK, sugiriendo que el crecimiento de células endometriales ectópicas puede estar bajo control genético (4).

También se ha encontrado relación entre la citotoxicidad de los macrófagos peritoneales y el estadio de la endometriosis, encontrándose aumentada en los estadios mínima y leve y disminuida en los estadios moderada y severa. Se observó que la indometacina in vitro

aumenta la citotoxicidad de los macrófagos peritoneales y además la citotoxicidad también se incrementa con el tratamiento sistémico con Danazol y análogos de GnRH, resultados publicados por Braun y cols. (5). Oosterlynck reportó que la citotoxicidad de las células NK se encuentra disminuida en mujeres con endometriosis durante la fase folicular del ciclo menstrual sugiriendo que los esteroides sexuales podrían estar relacionados con la función de las células NK(6). En otro reporte Kanzaki y cols. obtuvieron supresión de células NK al ser expuestas a suero de pacientes con endometriosis, concluyendo que este pudiera ser un mecanismo para la implantación del endometrio ectópico (7). También existen otros reportes que apuntan a la relación del sistema inmune y los niveles de esteroides sexuales como el de Garzetti (8) el cual observó que la disminución de la citotoxicidad de las células NK en mujeres con endometriosis correlaciona con la concentración de estrógenos, en ese estudio a mayor cantidad de estrógenos mayor fué la supresión de la citotoxicidad de las células NK.

Oosterlynck (9) realizó un ensayo de inmunosupresión utilizando un inductor de mitogénesis inespecífica observando que la actividad de las células NK es disminuida al ser expuestas a líquido peritoneal de mujeres con endometriosis. Ho (10) también reportó citotoxicidad disminuida de células NK en endometriosis el sugiere un defecto funcional de estas células de defensa. Sin embargo recientemente a pesar de los reportes previos, que indican una función deficiente de la actividad citotóxica de las células NK, D'Hooghe y cols. en un estudio experimental utilizando primates no observaron diferencia de la citotoxicidad de las células NK en primates con y sin endometriosis (11).

Existen otros reportes involucrando a la respuesta inmune celular en el desarrollo de la endometriosis como el de Viganò (12) el cual propone que alteraciones en el reconocimiento inmunológico puede ser uno de los mecanismos fisiopatológicos en la endometriosis. También se ha reportado la secreción de proteína quimiotáctica de monocitos durante la incubación de células endometriales de pacientes con endometriosis con interleucina 1B o Factor de Necrosis Tumoral alfa (13). Rier y cols. (14) encontraron una producción deficiente de interleucina 6 en respuesta a endotoxina en pacientes con endometriosis. Otros autores (15) han propuesto que la localización de complemento (c3) en el epitelio

glandular puede sugerir el papel de mecanismos protectores intrínsecos en estas células del ataque de complemento in vivo. Se ha reportado recientemente niveles elevados de Factor de Transformación de Crecimiento (TGF- β) en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, lo que podría ser parte del mecanismo del desarrollo de esta enfermedad(16). Khorram y cols. (17) reportaron concentraciones elevadas de la citocina RANTES en pacientes con endometriosis moderada y severa, indicando que esta citocina pudiera tener una función importante en el reclutamiento de macrófagos peritoneales en endometriosis.

Como se puede observar existen múltiples reportes en la literatura acerca de los mecanismos que involucran a la respuesta inmune celular y que posiblemente estén envueltos en el desarrollo de la endometriosis.

El brazo humoral de la respuesta inmune también ha sido investigado, Gentry y cols. (18) no encontraron un aumento significativo de anticuerpos antisperma en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, concluyendo que el aumento de la fagocitosis de espermatozoides en pacientes con endometriosis no es el resultado del aumento de anticuerpos antisperma en el líquido peritoneal de estas pacientes. La búsqueda de anticuerpos en pacientes con endometriosis ha sido estimulada debido a reportes como el de Kennedy y cols. (19) quienes al estudiar a mujeres con endometriosis encontraron niveles elevados de anticuerpos anticardiolipinas en una gran parte de ellas. Confino y cols. (20) reportaron disminución de IgG total en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, sin embargo encontraron aumento de autoanticuerpo específico IgG en este líquido. Mathur y cols. (21) observaron la existencia de antígenos en el endometrio e implantes de endometriosis que producen una respuesta aumentada de IgG, los cuales pueden ser relevantes en la relación de autoinmunidad y endometriosis. Odukoya y cols. (22) encontraron una correlación positiva en la fijación de IgG en pacientes con endometriosis, y concluyen que se pueden encontrar anticuerpos IgG en 50% de las pacientes con endometriosis, pero existe la duda que si estas pacientes pertenecen a un subgrupo de esta enfermedad. Badaway y cols. (23) reportaron que la concentración de anticuerpos antiendometriales fue significativamente más alta en pacientes con endometriosis que en los

controles, ellos encontraron niveles mayores de anticuerpos en suero que en el líquido peritoneal. Estos resultados sugieren que el ensayo de anticuerpos antiendometrio es específico y valioso para el diagnóstico y evaluación del progreso de la enfermedad.

Cunningham y cols. (24) reportaron aumento en la concentración de anticuerpos antiendometrio en los estadios iniciales de la endometriosis y niveles disminuidos de estos en los estadios más avanzados. Kennedy y cols. (25) observaron una respuesta de los anticuerpos a el tratamiento médico de la endometriosis, encontrando que el danazol y los análogos de GnRH disminuyen la concentración de anticuerpos antiendometrio, ocurriendo esto a niveles significativos solo con la nafarelina.

Sin embargo Switchenko y cols. (26) cuestionando la existencia de anticuerpos antiendometriales en el suero de mujeres con endometriosis, reporta que la asociación entre la autoinmunidad endometrial con la endometriosis falta aún ser establecida. Tal parece que la divergencia de los reportes acerca de estos puntos, pudiera deberse a diferencias metodológicas en los estudios, tal como sugiere Wild y cols. (27) ellos realizaron un estudio donde encontraron que todas las mujeres con endometriosis sometidas a inmunofluorescencia indirecta tuvieron tinción de citoplasma positiva, concluyendo que las variaciones utilizadas en la metodología reportadas por otros autores son las razones posibles para no encontrar anticuerpos antiendometriales.

Otras líneas de investigación han surgido con el fin de explicar el desarrollo de la endometriosis tal es el papel de factores angiogénicos en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, Oosterlynck y cols. (28) reportaron que el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis contiene más factores angiogénicos que el mismo de mujeres sin endometriosis, concluyen que esta actividad angiogénica pudiera ser importante para el crecimiento y progresión de las lesiones endometriósicas. Evers (29) hace una reflexión acerca de las piezas que conforman el rompecabezas de la endometriosis. Las primeras piezas muestran que todo empieza con la separación de dos tejidos funcionales, el endometrio funcional del endometrio basal. Fragmentos del endometrio funcional refluyen a través de las trompas de Falopio y alcanzan el esencialmente hostil, medio ambiente de la cavidad peritoneal. Actividad proteolítica, macrófagos activados y células natural killer

todos se combinan para degradar y digerir los fragmentos de tejido ectópicos. Células aisladas que escapan este sistema de defensa pierden sus propiedades adheivas y no se implantan. Ocasionalmente fragmentos mayores de tejido endometrial tienen éxito en evadir las líneas de defensa peritoneal, posiblemente por su número mayor de células, posiblemente por un defecto intrínseco en el sistema de defensa. Aun así, la endometriosis no se desarrollará, por que una superficie peritoneal intacta previene la implantación. Microtrauma a el peritoneo expondrá la matriz extracelular, entonces la implantación exitosa podrá ocurrir, y la angiogénesis ciclica en el tracto reproductor femenino, la cual es crítica para la reproducción humana normal, permitirá la sobrevivencia y crecimiento del endometrio ectópico y el desarrollo y remodelamiento tisular cíclico subsecuente. Esta intrincada relación entre el tejido ectópico y el huésped resultará en el desarrollo de endometriosis si el sistema inmunológico falla en su función.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La endometriosis como la definió Sampson en 1928 consiste en la presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de la cavidad endometrial (1). El postuló la teoría del reflujó menstrual a través de las trompas de falopio como la causa de la enfermedad. También existen otras teorías para explicar el desarrollo de la endometriosis como son la metaplasia celómica, la diseminación linfática y hematogéna, la diseminación istrogéna, pero la que ha llamado poderosamente la atención en los últimos años es la inmunológica. Existe asociación entre endometriosis y respuesta inmunológica alterada, sin embargo los mecanismos por los cuales la inmunidad celular y/o humoral previenen o permiten el crecimiento ectópico del endometrio autólogo aun requiere mayor investigación.

IV. JUSTIFICACION

La endometriosis se presenta en el 2 al 5% de la población general. En la época reproductiva se calcula que el 25% de las mujeres manifiesta datos clínicos de esta enfermedad. En mujeres con esterilidad, la incidencia puede llegar hasta el 20-40%, sin embargo a pesar de su frecuencia y de sus repercusiones tanto reproductivas como las de dolor pélvico crónico, no se ha identificado con certeza la etiología y fisiopatogenia de esta enfermedad, lo cual sin duda hace más difícil el manejo, el pronóstico y consejo a este grupo de pacientes.

V. HIPOTESIS

- 1. Existen diferencias en la composición de las subpoblaciones de leucocitos contenidas en el microambiente peritoneal de pacientes con endometriosis, las cuales condicionan un ambiente en el que la supresión del sistema inmune es la característica principal.**
- 2. Existen moduladores solubles contenidos en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis que actúan como inmunosupresores.**

VI. OBJETIVOS

- 1. Cuantificar y comparar las subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica y líquido peritoneal de mujeres con endometriosis y sin endometriosis.**
- 2. Evaluar la presencia de actividad inmunosupresora en sangre periférica y líquido peritoneal de mujeres con endometriosis y sin endometriosis.**

VII. MATERIAL Y METODOS

CRITERIOS DE INCLUSION

1. *Pacientes a las cuales se les realice laparoscopia como parte del estudio de esterilidad.*
2. *En las que se establezca la presencia o ausencia de endometriosis.*
3. *Pacientes a las cuales se aspire liquido peritoneal sin contaminación hemática.*
4. *Pacientes en las que se obtenga una muestra de sangre periférica.*

CRITERIOS DE EXCLUSION

1. *Pacientes con datos de enfermedad pélvica inflamatoria aguda*
2. *Pacientes en las que no sea posible la aspiración de liquido peritoneal o que este liquido se encuentre teñido de sangre o francamente hemático.*
3. *Pacientes en las que no se cuente con una muestra de sangre periférica.*
4. *Pacientes que no estén de acuerdo con el estudio.*

TOMA DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS.

Se estudiaron 26 pacientes que acudieron a el INPer para estudio de esterilidad y que fueron sometidas a laparoscopia. Con endometriosis se estudiaron 12 pacientes y como controles fueron 14 pacientes con esterilidad sin endometriosis. La laparoscopia se realizó de manera convencional, realizando una incisión vertical transumbilical, colocando una aguja de Veress e insuflando CO2 hasta obtener una presión de 12mmhg con 3lts. de CO2. Se procedió a introducir trocar principal de 10mm , a través del cual se introduce el videolaparoscopio, se procede a realizar segunda punción suprapubica en línea media para colocar trocar secundario de 5mm.

Se procede a revisión de la cavidad peritoneal y a aspirar líquido libre de fondo de saco antes de realizar la cromotubación o algún otro procedimiento operatorio. Una vez obtenido el líquido es colocado en un tubo de ensayo cónico de 15 cm. y puesto en refrigeración.

Todas las pacientes recibieron anestesia general para el procedimiento. Las cirugías fueron programadas durante la fase proliferativa del ciclo menstrual. Antes de iniciar la laparoscopia se obtuvieron 10cc de sangre periférica en tubos heparinizados, la cual se dejó a temperatura ambiente por 20 minutos y posteriormente se colocó en refrigeración para evitar la lisis celular en caso de cambios bruscos de temperatura. Una vez terminada la cirugía la sangre periférica y el líquido peritoneal fueron trasladados al Departamento de Bioquímica para su procesamiento.

PREPARACION DE SUBPOBLACIONES CELULARES DEL LIQUIDO PERITONEAL Y SANGRE PERIFERICA.

Los líquidos peritoneales obtenidos conforme a la sección previa fueron procesados de manera inmediata mezclando el volumen total del líquido con un volumen equivalente de medio de cultivo RPMI 1640, adicionando con 10% de suero fetal de ternera, 100U/ml de penicilina, 10 mcg/ml de estreptomizina, 20 mM de glutamina, 2.0 g/L de bicarbonato de sodio y 500mM de mercaptoetanol.

Las muestras de sangre periférica se incubaron a temperatura ambiente para sedimentar los

eritrocitos y se analizaron después de purificar los leucocitos. Las muestras de líquido peritoneal y las de sangre periférica fueron analizadas para viabilidad con azul tripan, fueron desechadas si la viabilidad era menor del 90%.

ANALISIS DE SUBPOBLACIONES CELULARES CON CITOMETRIA DE FLUJO

Las células preparadas según la sección anterior fueron teñidas con anticuerpos monoclonales de ratón con el sistema Simultest IMK-Lymphocyte (Beckton Dickinson, USA). Este es un sistema de inmunofluorescencia directa con dos cromógenos ligados a anticuerpos dirigidos contra los siguientes determinantes antigenicos: CD3+, CD19+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+, CD56+. Estos determinantes permiten calcular la cantidad de linfocitos T (CD3+), linfocitos cooperadores/inductores (CD3+CD4+) , linfocitos supresores/citotoxicos (CD3+CD8+) y células natural killer (CD3-CD16+). Cuando los anticuerpos fluorescentes son agregados a las células aisladas, estas reconocen a los determinantes antigenicos enclavados en la membrana y permiten distinguir entre las diferentes poblaciones mencionadas. Una vez realizada esta tinción, se lisaron los leucocitos con una solución de cloruro de amonio, se lavaron para eliminar todos los reactivos utilizados y se fijaron para su análisis en una solución de formaldehído. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo modelo Facscan (Beckton Dickinson, USA).

PRUEBA DE SUPRESION DE RESPUESTA CLONAL EN LINFOCITOS PERIFERICOS

Preparación de linfocitos periféricos. Se obtuvieron muestras de 20 ml de sangre periférica de cinco donadoras sanas. Las muestras fueron anticoaguladas con citratos y se dejaron reposar a temperatura ambiente 30 minutos con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de eritrocitos. El sobrenadante total de esta sedimentación se diluyó 1:1 con solución salina amortiguada y se agregó en la parte superior de tubos que contenían Lymphoprep (Ficoll-metrizoato de sodio, Nycomed, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra se centrifugó a 400 xg durante 15 minutos y al final se separó cuidadosamente la interfase entre la muestra y el Lymphoprep. Las células de esta interfase se lavaron por

centrifugación a 100 xg por dos ocasiones con 20 ml de medio de cultivo RPMI 1640 para eliminar el Lymphoprep. Los linfocitos lavados se contaron en un hemocitómetro de acuerdo con la técnica estándar.

ESTIMULACION CON MITOGENOS

Los linfocitos purificados se suspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera descomplementado y se sembraron en cajas de 96 pozos (2 x 100,000 cels./pozo). Las células se dejaron estabilizar durante dos horas en atmósfera de 5% CO₂/95% aire y entonces se agregó en secuencia concanavalina A (ConA, Sigma Chemical Co, USA) 1.0 µg/mL, 1.0 mCi/ml de timidina 3-H (New England Nuclear, USA) y líquido peritoneal o suero de cada una de las pacientes en estudio. Cada caja utilizada incluyó al menos 5 pozos de control negativos en los que no se agregó el mitógeno ConA y otros 5 pozos en los que no se agregó líquido peritoneal o suero pero sí ConA. Los linfocitos se mantuvieron en incubación durante 18 horas y al final de éste periodo, se recolectaron y lavaron con ayuda de un cosechador automático, que en breve, toma las células de cada pozo, las rompe con choque osmótico y hace pasar el material lisado por un filtro en el que se queda unido el DNA; después de lavar extensivamente este filtro, para eliminar toda la marca radioactiva no incorporada al material genético, se colectó cada uno de los filtros y se distribuyeron en placas de pozos múltiples en las que se agregó 200 µL de líquido de centelleo Microscint (Packard, USA) y la radioactividad de cada pozo se cuantificó en un contador de centelleo modelo Top Count (Packard, USA). Este método mide mitogénesis por incorporación de timidina marcada, de manera que entre más radioactividad se acumule por pozo significa que las células experimentaron mayor índice de duplicación.

VIII. RESULTADOS

En este estudio observacional, prospectivo, transversal con grupo de comparación, se incluyeron 26 pacientes estériles: 12 pacientes con endometriosis (endometriosis mínima 4 pacientes, leve 5 pacientes y moderada 3 pacientes) y 14 pacientes sin endometriosis. Los intentos de incluir pacientes fértiles normales (sometidas a salpingoclasia por laparoscopia) resultaron infructuosos pues el número de células aisladas del líquido peritoneal fue insuficiente para su análisis. La edad promedio del grupo de pacientes con endometriosis por estadios fue la siguiente: endometriosis mínima 30.0 (r 24-35), endometriosis leve 31.6 años (r 29-34), endometriosis moderada 32.6 años (r 31-35). Para el grupo de pacientes estériles sin endometriosis la edad promedio fue 27.14 años (16-33). La menarca fue de los 9 a los 14 años en todas las pacientes, no existiendo diferencia significativa entre el grupo de pacientes con endometriosis y sin endometriosis.

Con respecto al cuadro clínico dos de las pacientes con endometriosis leve presentaron dismenorrea y ninguna dispareunia. En el grupo de pacientes sin endometriosis cuatro refirieron dismenorrea y dos dispareunia. Todas las pacientes con diagnóstico de endometriosis presentaron lesiones en el fondo de saco de Douglas y en los ligamentos uterosacros. De las pacientes con esterilidad sin endometriosis en una de ellas se encontraron miomas subserosos, en dos de ellas oclusión tubaria distal, dos pacientes con oclusión tubaria medial, 3 pacientes con procesos adherenciales y una paciente con un tabique uterino completo diagnosticado por histeroscopia.

En cuanto al análisis de subpoblaciones celulares por grupo encontramos los siguientes datos basados en los valores de referencia normales en sangre periférica (tabla 1). Endometriosis mínima (gráfica 1), linfocitos T aumentados en líquido peritoneal, linfocitos B disminuidos en líquido peritoneal. Endometriosis leve y moderada (gráfica 2 y 3), linfocitos B disminuidos en el líquido peritoneal, disminución de linfocitos cooperadores y aumento de supresores en el líquido peritoneal, es decir relación cooperadores/supresores alterada. (análisis estadístico con prueba t-student, desviación estándar y media (tablas 2, 3, 4).

Las pacientes estériles sin endometriosis mostraron los siguientes datos: aumento de linfocitos T en el líquido peritoneal, disminución de linfocitos B en el líquido peritoneal, disminución de cooperadores y aumento de supresores, aumento de linfocitos T activados en el líquido peritoneal y aumento de las células natural killer en sangre periférica. (gráfica 4 y tabla 5).

Al realizar las comparaciones del análisis estadístico con la prueba t-student en todos los grupos encontramos lo siguiente, al estudiar las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica: no existió diferencia en las subpoblaciones de linfocitos T totales (tabla 6), linfocitos B (tabla 7), ni en la cantidad de linfocitos T activados (tabla 11). Se encontró alterada la relación entre linfocitos cooperadores y supresores en las pacientes con endometriosis, siendo esta más notoria en las de endometriosis moderada (tablas 8, 9 y 10). Las células natural killer se encontraron significativamente elevadas en el grupo de pacientes con endometriosis leve y moderada, al compararlas con el resto de las pacientes (tabla 12).

Con referencia al líquido peritoneal, no existió diferencia entre las subpoblaciones de linfocitos T totales (tabla 13), linfocitos B (tabla 14), cooperadores (tabla 15), supresores (tabla 16) y natural killer (tabla 19) entre los diferentes grupos de pacientes. La única diferencia significativa fue la cantidad de linfocitos T activados disminuida en las pacientes con endometriosis leve al compararlas con las pacientes sin endometriosis (tabla 18).

En cuanto al ensayo de supresión de la respuesta mitogénica inducida por concanavalina A mostró la presencia de factores solubles presentes exclusivamente en el líquido peritoneal de pacientes con diagnóstico de endometriosis y que suprimen de manera constante la respuesta mitogénica en linfocitos periféricos humanos y que se aprecia en la estimulación dosis respuesta. Aunque la supresión de la mitogénesis inespecífica oscila en un rango de 30 a 123%, se presentó en todos los casos con endometriosis y en ninguno de los líquidos peritoneales de las pacientes estériles sin endometriosis. (obsérvese gráfica 17 y 18). Cabe señalar que la actividad supresora solo se encontró en el líquido peritoneal, la respuesta no se encontró en sangre periférica.

IX. DISCUSION

El papel que la inmunidad juega en el desarrollo de la endometriosis ha tratado de ser explicado por los diversos hallazgos en los experimentos realizados en la última década, sin embargo, es posible que la diversidad de los reportes sea debida a que la endometriosis es una enfermedad dinámica y que cada hallazgo aislado refleje simplemente un momento de la enfermedad. Sin duda las diferentes metodologías utilizadas por los diversos autores, además de la imposibilidad de sincronizar todas las variables que de alguna manera influyen en la fisiopatogenia de la endometriosis, hacen el análisis de la información más complicado y confuso.

En el presente estudio, se han encontrado hallazgos interesantes, al realizar las comparaciones se observa que en todos los grupos existe una inclinación hacia la inmunosupresión en el microambiente peritoneal, siendo esta mas pronunciada en las pacientes con endometriosis moderada. También es de notar la disminución de linfocitos T activados en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis leve. Los linfocitos B se encontraron disminuidos en todos los grupos de pacientes en el líquido peritoneal.

Al analizar las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica se encontró la cantidad de cooperadores disminuidos y la cantidad de supresores/citotóxicos aumentada, teniendo esto relación con la severidad de la endometriosis, siendo más alterada en las pacientes con endometriosis moderada. La subpoblación de natural killer se encontró elevada en sangre periférica en las pacientes con endometriosis leve y moderada, no así en los casos de endometriosis mínima.

Analizando estos patrones podemos pensar que exista una alteración en la respuesta inmunológica, posiblemente la respuesta sistémica es adecuada en estas pacientes al encontrar niveles elevados de células natural killer en respuesta al tejido endometrial ectópico, y que la alteración en la relación de linfocitos T cooperadores (CD4+) y linfocitos T supresores/citotóxicos (CD8+), sea debida a que el brazo se encuentre inclinado hacia la producción de linfocitos citotóxicos, en respuesta a la endometriosis. El encontrar el microambiente peritoneal inclinado hacia la inmunosupresión, como lo demuestra una

relación más alterada entre los linfocitos cooperadores y supresores, y niveles más bajos de linfocitos T activados, invita a la posibilidad de que la respuesta inmunológica a nivel local no sea eficiente y permita la sobrevivencia e implantación del tejido endometrial ectópico. También es factible que la respuesta inmune este funcionando normalmente si la disminución de linfocitos B es debida a que se este llevando a cabo la síntesis de inmunoglobulinas, y que de esta misma manera la relación alterada entre CD4+/CD8+ sea debida a la diferenciación hacia linfocitos T citotóxicos.

Pero evidentemente existen factores inmunosupresores en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis como lo han descrito otros autores (9) y como se confirmó en este ensayo con concanavalina, sin embargo la caracterización de estos compuestos en el futuro es necesaria para un mejor entendimiento de la endometriosis.

Posiblemente el papel de la respuesta inmune no sea el único responsable del desarrollo de la endometriosis, sino participe en una serie de eventos que juntos tal como lo menciona Evers (29), permitan que los fragmentos de endometrio ectópico que pasan a través de las trompas de Falopio, sobrevivan al no ser destruidos por las líneas de defensa del organismo, se implanten en una superficie peritoneal microtraumatizada y por la acción de factores endocrinos y factores angiogénicos, estos implantes ectópicos reciban vascularización y puedan establecerse y proliferar.

Gracias a los esfuerzos en la investigación mundial, cada día estamos mas cerca de comprender con certeza los mecanismos implicados en el desarrollo de la endometriosis, y sin duda esto nos permitirá llevar a cabo un tratamiento más preciso y acertado, obteniendo mejores resultados en el manejo de las pacientes con esterilidad y endometriosis, sin olvidar al gran número de mujeres afectadas por el dolor pélvico crónico que produce esta enigmática enfermedad.

X. TABLAS

Y

GRAFICAS

Tabla I

**SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS
VALORES NORMALES DE REFERENCIA EN SANGRE PERIFERICA**

CD3	CD19	CD4	CD8	CD4/CD8	HLADR	CD1656
62.8 - 85	7.1 - 23.3	31.4 - 56	18.9 - 47	0.7 - 2.3	2.8 - 17.3	4.8 - 26

Comparaciones intragrupo**Tabla 2****Pacientes con endometriosis mínima (n=4)**

Subpoblación	media	desviación estándar	error estándar	P
CD3SP	66.70	5.95	2.97	0.038
CD3LP	74.20	5.75	2.87	
CD19SP	15.35	4.17	2.08	0.005
CD19LP	1.00	0.94	0.47	
CD4SP	35.50	3.42	1.71	NS
CD4LP	19.92	13.48	6.74	
CD8SP	31.90	6.69	3.34	NS
CD8LP	34.42	23.24	11.62	
HLA DR SP	20.07	13.92	6.96	NS
HLA DR LP	17.32	25.20	12.60	
CD 16 56 SP	6.57	8.00	4.00	NS
CD 16 56 LP	7.35	3.63	1.81	

Comparaciones intragrupo
Tabla 3
Pacientes con endometriosis leve (n=5)

Subpoblación	media	desviación estándar	error estándar	P
CD3SP	67.50	3.06	1.37	NS
CD3LP	71.38	6.51	2.91	
CD19SP	11.14	3.31	1.48	0.003
CD19LP	0.65	0.68	0.30	
CD4SP	38.98	2.33	1.04	0.001
CD4LP	23.32	2.84	2.16	
CD8SP	29.64	4.73	2.11	0.016
CD8LP	45.66	5.11	2.28	
HLA DR SP	10.31	4.65	2.08	NS
HLA DR LP	8.67	6.85	3.06	
CD 16 56 SP	19.67	3.89	1.74	NS
CD 16 56 LP	14.11	7.25	3.24	

Comparaciones intragrupo
Tabla 4
Pacientes con endometriosis moderada (n=3)

Subpoblación	media	desviación estándar	error estándar	P
CD3SP	65.86	7.15	4.13	NS
CD3LP	72.03	10.45	6.03	
CD19SP	9.77	0.49	0.28	0.000
CD19LP	0.83	0.34	0.20	
CD4SP	26.66	2.51	1.45	0.048
CD4LP	15.23	6.66	3.84	
CD8SP	42.56	2.73	1.58	NS
CD8LP	56.23	10.19	5.88	
HLA DR SP	14.86	3.31	1.91	NS
HLA DR LP	5.86	5.08	2.93	
CD 16 56 SP	19.40	3.00	1.73	NS
CD 16 56 LP	5.86	5.08	2.93	

Comparaciones intragrupo
Tabla 5
Pacientes sin endometriosis (n=14)

Subpoblación	media	desviación estándar	error estándar	P
CD3SP	66.10	7.25	1.93	0.032
CD3LP	73.00	12.16	3.25	
CD19SP	10.88	4.07	1.08	0.000
CD19LP	1.95	3.77	1.00	
CD4SP	33.44	5.47	1.46	0.000
CD4LP	23.61	6.64	1.77	
CD8SP	35.05	8.72	2.33	0.002
CD8LP	47.48	7.90	2.11	
HLA DR SP	11.92	5.99	1.49	0.046
HLA DR LP	20.95	15.87	4.24	
CD 16 56 SP	18.27	8.67	2.31	0.009
CD 16 56 LP	9.76	6.60	1.76	

Comparaciones intergrupo**Tabla 6****Sangre periférica**

CD3	Minima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Tabla 7**Sangre periférica**

CD19	Minima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Tabla 8**Sangre periférica**

CD4	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			0.002
Moderada			
Sin endometriosis	NS	0.007	0.013

Comparaciones intergrupo**Tabla 9
Sangre periférica**

CD8	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	0,043
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

**Tabla 10
Sangre periférica**

CD4/CD8	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

**Tabla 11
Sangre periférica**

HLA DR	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Comparaciones intergrupo**Tabla 12****Sangre periférica**

CD 16 56	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		0,038	0,042
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Comparaciones intergrupo**Tabla 13****Líquido peritoneal**

CD3	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Tabla 14**Líquido peritoneal**

CD19	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Comparaciones intergrupo**Tabla 15****Líquido peritoneal**

CD4	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Tabla 16**Líquido peritoneal**

CDS	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

Tabla 17**Líquido peritoneal**

CD4/CDS	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

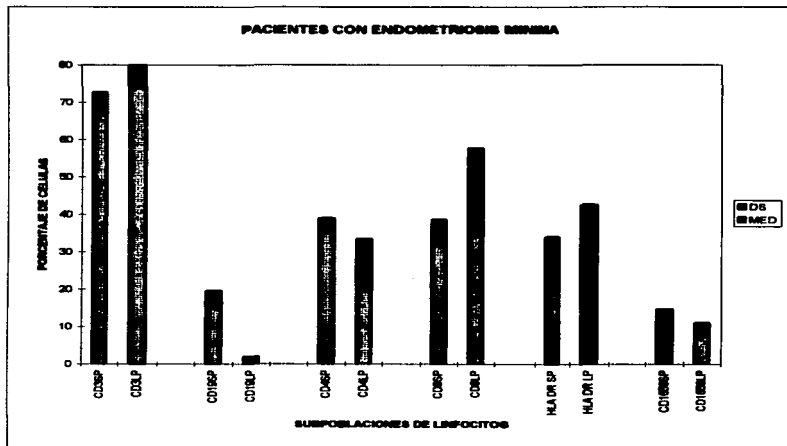
Comparaciones intergrupo**Tabla 18****Líquido peritoneal**

HLA DR	mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	0.032	NS

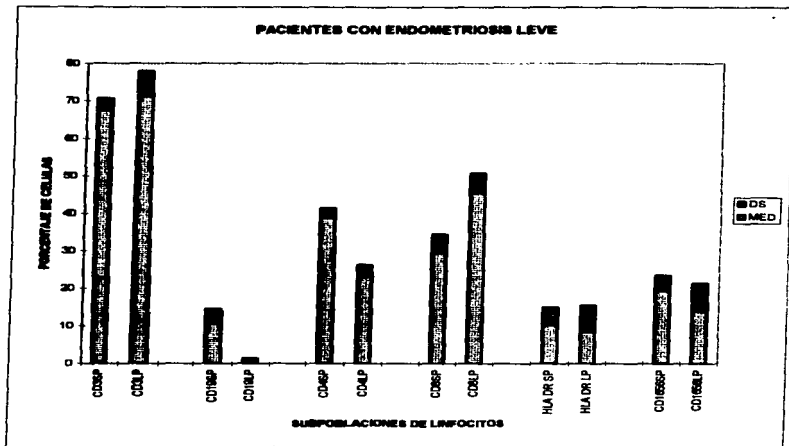
Tabla 19**Líquido peritoneal**

CD16 56	Mínima	Leve	Moderada
Mínima		NS	NS
Leve			NS
Moderada			
Sin endometriosis	NS	NS	NS

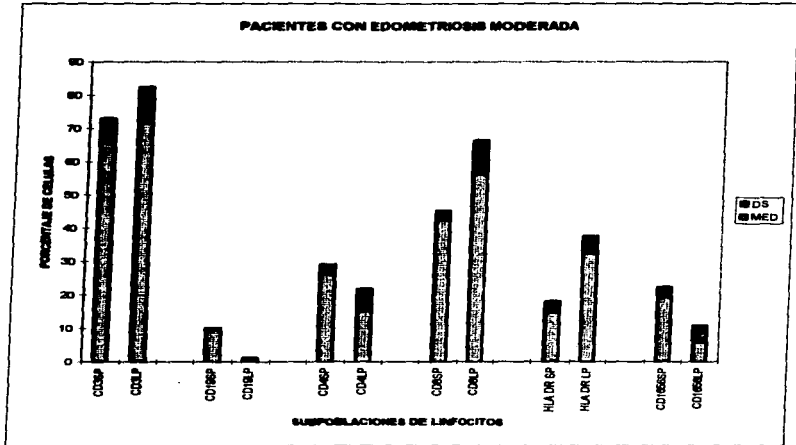
GRAFICA 1



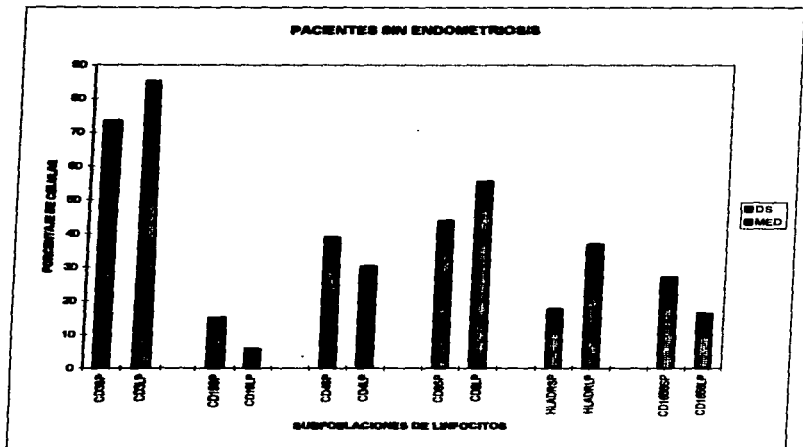
GRAFICA 2



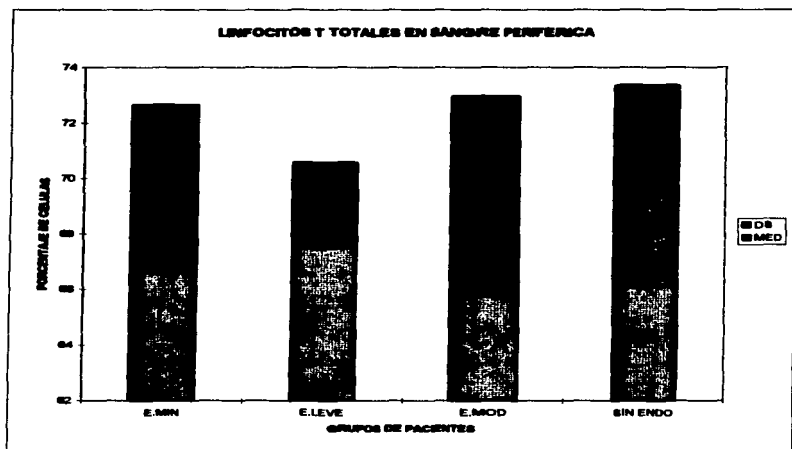
GRAFICA 3



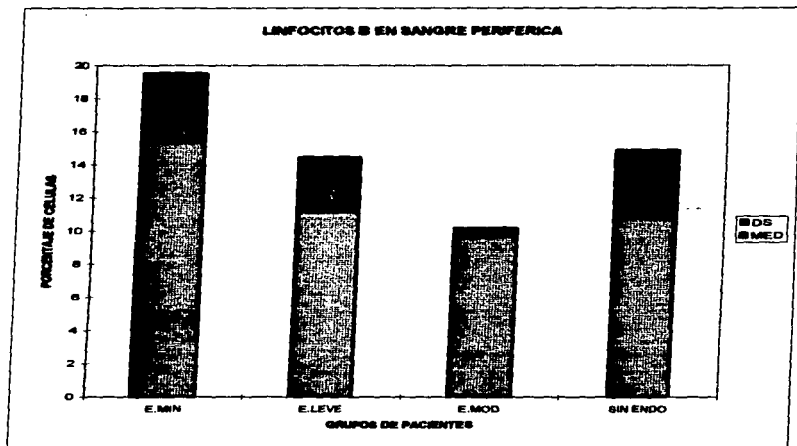
GRAFICA 4



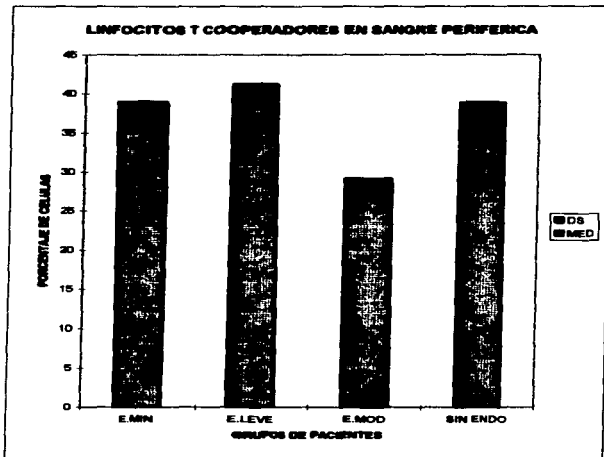
GRAFICA 5



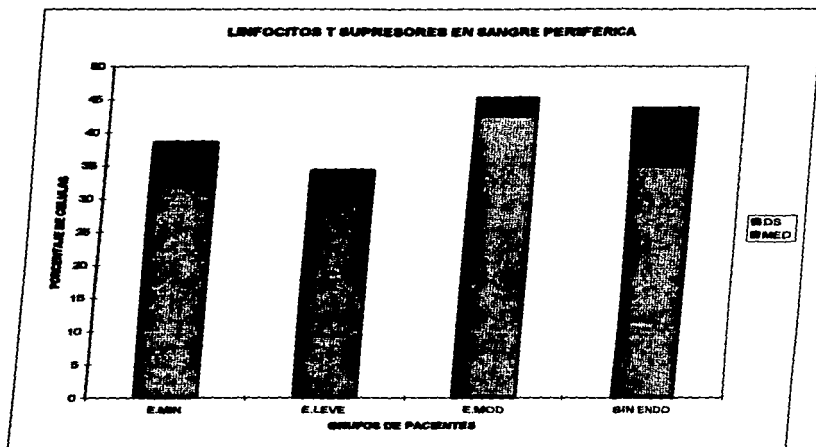
GRAFICA 8



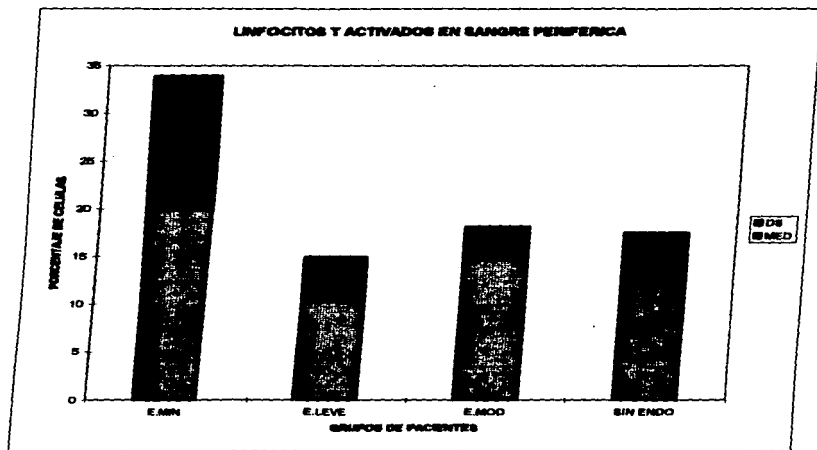
GRAFICA 7



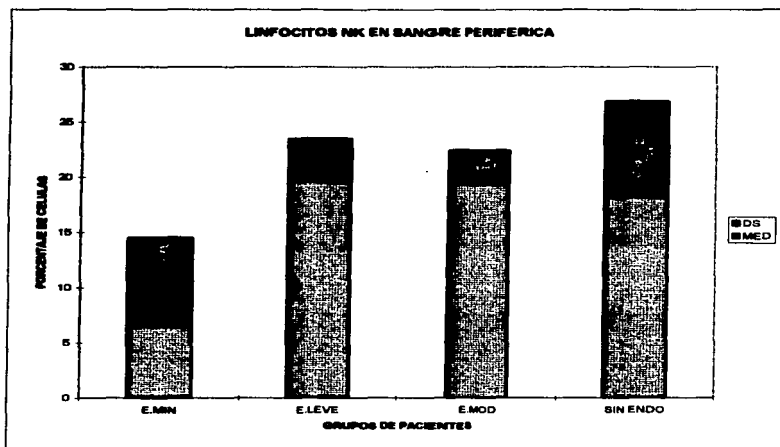
GRAFICA 8



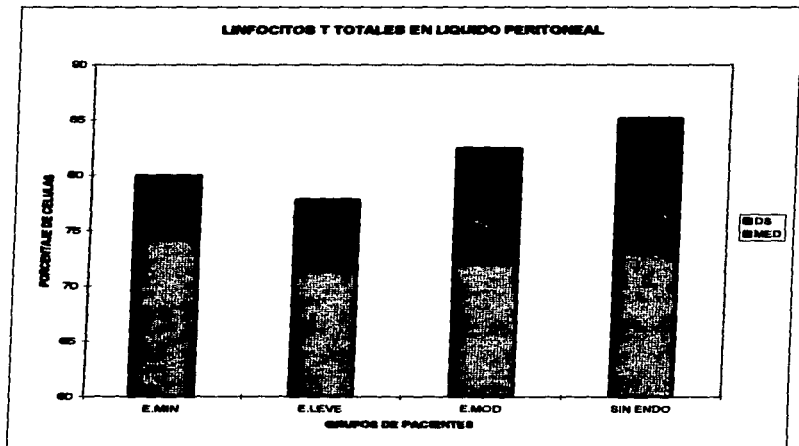
GRAFICA 9



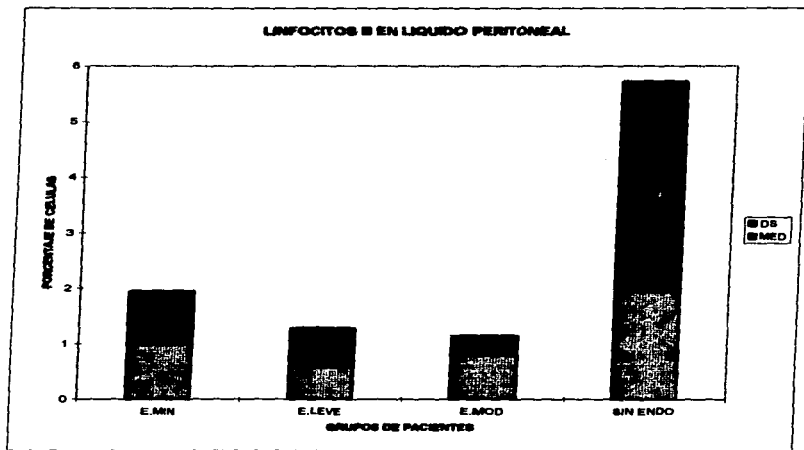
GRAFICA 10



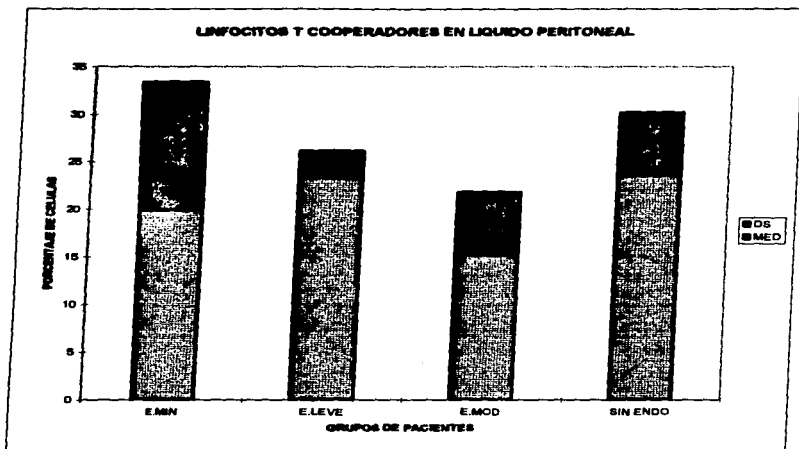
GRAFICA 11



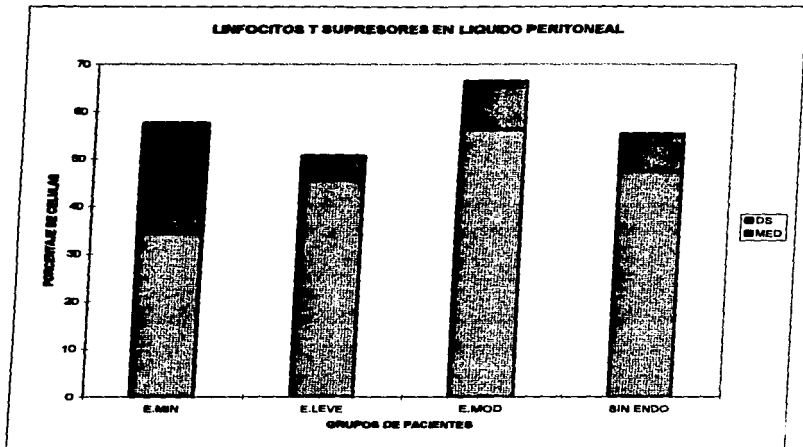
GRAFICA 12



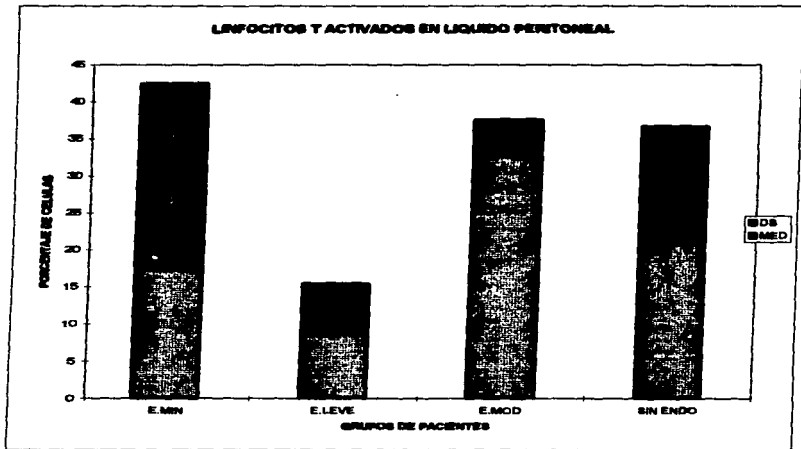
GRAFICA 13



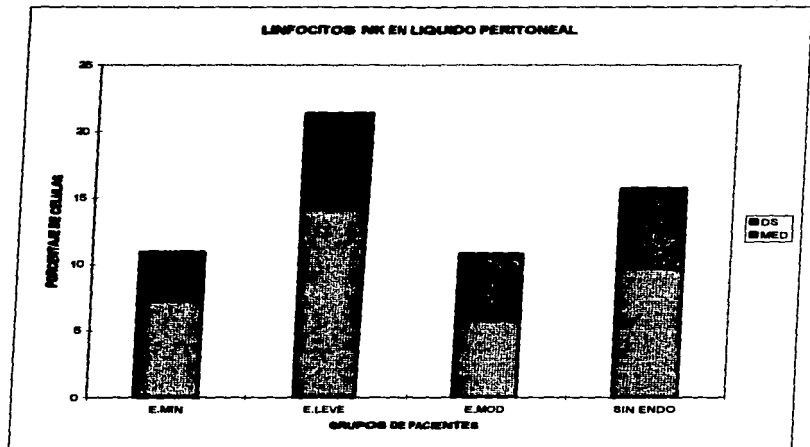
GRAFICA 14



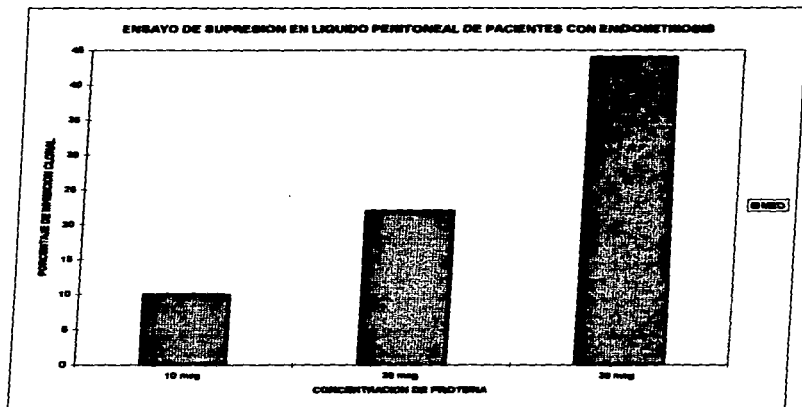
GRAFICA 15



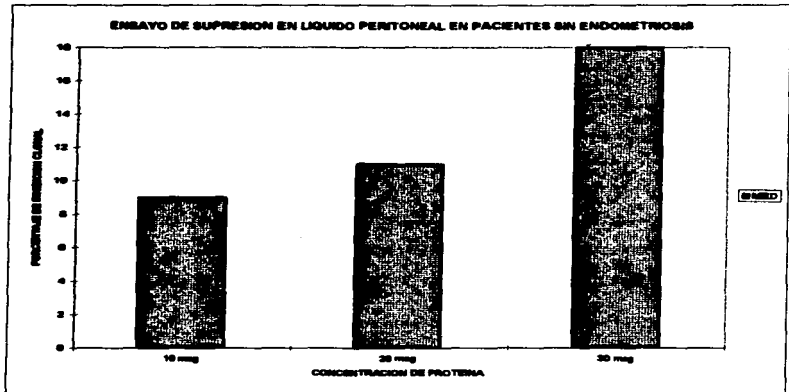
GRAFICA 16



GRAFICA 17



GRAFICA 18



XL. CONCLUSIONES

- 1. Las pacientes con endometriosis leve y moderada presentan niveles elevados de células NK en sangre periférica.**
- 2. Las pacientes con endometriosis leve y moderada presentan una relación de linfocitos cooperadores/supresores alterada en el líquido peritoneal, inclinada hacia la inmunosupresión.**
- 3. Los linfocitos T activados se encuentran disminuidos en el líquido peritoneal en las pacientes con endometriosis.**
- 4. Existen factores solubles en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis con actividad inmunosupresora.**
- 5. La inmunosupresión en el microambiente peritoneal de las pacientes con endometriosis juega un papel determinante en la histogénesis de la endometriosis.**

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

XII. BIBLIOGRAFIA:

1. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1928; 14:422.
2. Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50 (2):216-22.
3. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer FJ, Vandeputte M, Konicckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56 (1):45-51.
4. Semino C, Semino A, Pietra G, Mingari MC, Barocci S, Venturini PL, Ragni N, Melioli G. Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 64 (5):909-16.
5. Braun DP, Gebel H, Rotman C, Rana N, Dmowsky WP. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57 (6):1203-10.
6. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Konicckx PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58 (2):290-5.
7. Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167 (1):257-261.
8. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Fabris N, Cignitti M, Romanini C. Natural killer cell activity in endometriosis: Correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obstet Gynecol* 1993; 85 (5) (pt 1):665-8.
9. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Konicckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1993; 82 (2):206-12.
10. Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Lee TY. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulations are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10 (10):2671-5.
11. D'Hooghe TM, Scheerlinck JP, Konicckx PR, Hill JA, Bamba CS. Antiendometrial lymphocytotoxicity and natural killer cell activity in baboons (papio anubis and papio cynocephalus) with endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10 (3):558-62.

12. Vigano P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M: Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56 (5):894-9.
13. Akoum A, Lemay A, Brunet C, Herbert J. secretion of monocyte chemotactic protein-1 by cytokine-stimulated endometrial cells of women with endometriosis. Le groupe d'investigation en gynécologie. *Fertil Steril* 1995; 63 (2):322-8.
14. Rier SE, Parsons AK, Becker JL. Altered interleukin 6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61 (2):294-9.
15. C' Cruz OJ, Wild Ra. Evaluation of endometrial tissue specific complement activation in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57 (4):787-95.
16. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koniclx PR. Transforming growth factor beta-activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1994; 83 (2):287-92.
17. Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169 (6):1545-9.
18. Gentry WL, Buster JE, Schriock ED, Carson SA. Failure to demonstrate significant antisperm antibodies in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1989; 52 (6):949-52.
19. Kennedy SH, Nunn B, Cederholm-Williams SA, Barlow DH. Cardiolipin antibodies levels in endometriosis and systemic lupus erythematosus. *Fertil Steril* 1989; 52 (6):1061-2.
20. Confino E, Harlow L, Gleicher N. Peritoneal fluid and serum antibody levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 53 (2):242-5.
21. Mathur S, Garza DE, Smith LF: Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulins (IgG, IgA, and IgM responses in endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 54 (1):56-63.
22. Odukoya OA, Wheatcroft N, Weetman AP, Cooke ID. The prevalence of endometrial immunoglobulin G antibodies in patients with endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10 (5):1214-9.
23. Badaway SZ, Cuenca V, Frelich H, Stefanu C. Endometrial antibodies in serum and peritoneal fluid of infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 53 (5):930-2.

24. Cunningham DS, Hansen KA, Coddington CC. Changes in T cell regulation of responses to self antigens in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58 (1):114-9.
25. Kennedy SH, Sarkey PM, Sargent IL, Kicks BR, Barlow DH. Antiendometrial antibodies in endometriosis measured by an enzyme linked immunosorbent assay before and after treatment with danazol and nafarelin. *Obstet Gynecolo* 1990; 75 (60):914-8.
26. Switchenko AO, Kauffman RS, Recker M. Are there antiendometrial antibodies in sera of women with endometriosis? *Fertil Steril* 1991;56 (2):235-41.
27. Wild RA, Shivers CA, Medders D. Detection of antiendometrial antibodies in patients with endometriosis: Methodological issues. *Fertil Steril* 1992; 58 (3):518-21.
28. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M, Konickx PR. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59 (4):778-82.
29. Evers JLH: The defense against endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 66 (3):351-3.

**Parte de esta tesis fue presentada
en el VI Congreso Mexicano de
Ginecología y Obstetricia**



**LA FEDERACION MEXICANA DE GINECOLOGIA
Y OBSTETRICIA, A.C.**

Otorga

AL DR. JOSE MA. MOJARRA ESTRADA

DIPLOMA

**por haber obtenido
PRIMER LUGAR**

**en el área de
INVESTIGACION BASICA**

con su trabajo

" RESPUESTA INMUNE PERITONEAL EN ENDOMETRIOSIS "

México, D. F., noviembre 2 de 1995.


DR. JOSÉ ROBERTO AHUED AHUED

PRESIDENTE


DR. ELÍAS S. CANALES PÉREZ

SECRETARIO


DR. VICTORIANO LLAQA RODRIGUEZ

TESORERO