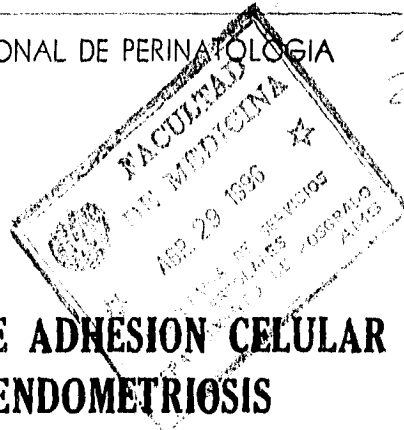


11204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



729

MOLECULAS DE ADHESION CELULAR EN LA ENDOMETRIOSIS

DR. ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS M. PROFESOR TITULAR

*Castro*

DR. ERNESTO CASTELAZO MORALES DIRECTOR DE ENSEÑANZA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN: BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA

P R E S E N T A :

DR. MANUEL PEREZ OCHARAN

Asesor: Dr. Felipe Vadillo Ortega



MEXICO, D. F.



1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

DR. FELIPE VADILLO ORTEGA  
ASESOR DE TESIS

-----

A MI ESPOSA  
POR SU COMPRENSION Y APOYO  
PARA ALCANZAR MIS METAS

A MIS HIJOS

MANUEL GILBERTO Y GABRIEL ALEJANDRO  
POR ENSEÑARME CON SUS RIAS Y SU LLANTO  
A VIVIR CON PLENITUD.

A MI ESPOSA  
POR SU COMPRENSION Y APOYO  
PARA ALCANZAR MIS METAS

A MIS HIJOS

MANUEL GILBERTO Y GABRIEL ALEJANDRO  
POR ENSEÑARME CON SUS RIAS Y SU LLANTO  
A VIVIR CON PLENITUD.

A MI PADRE  
DR. MANUEL PEREZ OROPEZA (Q.E.P.D.)  
POR SER MI GUIA Y MI MAESTRO

A MI MADRE  
ROSITA OCHARAN VDA. DE PEREZ

A MIS HERMANOS  
ROBERTO, ROSA MILA, RAFAEL, ADRIANA,  
EDUARDO Y MADELAINE

A MIS SUEGROS  
SR. GILBERTO MARTINEZ MADRID  
SRA. POMPOSA JAIMES DE MARTINEZ  
POR CONSTITUIRSE EN MIS SEGUNDOS PADRES  
CON EL MAS SINCERO CARIÑO

A MIS CUÑADOS  
EDUARDO, GABRIELA, NORMA ANGELICA Y JESUS GILBERTO  
POR APOYARME Y ESTIMULARME EN TODO MOMENTO

A MIS SOBRINOS

MANUEL, FABIOLA, ARMIDA, JEANNETTE, LUIS EDUARDO,

ROSA MILA, LUIS ALBERTO, HILDA MARIA Y CARLOS

RAFAEL

A CRISTIAN DAVID, JOSE RAMON, PAOLA Y EVA.

DESEANDO ENCUENTREN EN MI A UN AMIGO



A MI TUTOR  
DR. FELIPE VADILLO ORTEGA  
POR MOSTRARME EL CAMINO DE LA SUPERACION

AL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA  
POR FORJARME

**TABLA DE CONTENIDOS**

INDICE .....	08
INTRODUCCION .....	09
ETIOLOGIA .....	10
EPIDEMIOLOGIA .....	12
METODOS DE DIAGNOSTICO .....	14
MOLECULAS DE ADHESION .....	20
RAZONES PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACION .....	29
DEFINICION DE LOS OBJETIVOS .....	31
FORMULACION DE LA HIPOTESIS .....	32
MATERIAL Y METODO .....	33
RESULTADOS .....	42
DISCUSION .....	48
BIBLIOGRAFIA .....	51

## **INTRODUCCION**

La endometriosis es un padecimiento frecuente, que origina innumerables días de incapacidad. Se describió por primera vez en 1860, sin embargo, fuè hasta 1921 que con la publicación de Sampson se le reconoció como enfermedad. Se caracteriza por la presencia de proliferación de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina con capacidad de crecer, infiltrar y diseminarse (1). Produce una respuesta inflamatoria que evoluciona hacia la formación de fibrosis y adherencias; se sugiere también que representa un trastorno autoinmunitario con formación de anticuerpos y activación de células inmunes (2).

La endometriosis sólo ocurre cuando hay útero, sin embargo, se han descrito casos en vejiga urinaria de varones, así como en pacientes con agenesia mülleriana, lo que se ha atribuido a un efecto estimulante de los estrógenos (3).

Las glándulas y el estroma de la endometriosis responden de manera incompleta a la variación hormonal durante el ciclo menstrual. Se ha propuesto que aunque los esteroides ováricos pueden no ser necesarios para el inicio de la endometriosis, sí lo son para su supervivencia y

crecimiento, ya que la endometriosis sufre regresión con el cese de la función ovárica.

## **ETIOLOGIA**

Aún se desconoce la etiología de este padecimiento, pero se ha propuesto que factores como la menarquia temprana, ciclos menstruales cortos, menstruaciones prolongadas y factores hereditarios, pueden tener importancia causal.

Existen a su vez tres teorías importantes en la histogénesis de la endometriosis: transportación, formación in situ y una combinación de ambas.

Un primer grupo de teorías postula su origen a partir del trasplante de células endometriales que emigran a través de las trompas, los vasos linfáticos o sanguíneos, siembras peritoneales o en ocasiones de intervenciones ginecológicas.

Otra teoría sugiere el inicio de la enfermedad por metaplasia de las células celómicas totipotenciales, bajo la acción de estímulos inflamatorios, químicos u hormonales (4).

La comprobación de ciertas variedades de endometriosis, caracterizadas por la presencia de bolsillos o soluciones de continuidad en el peritoneo pélvico, ha llevado a plantear su

posible origen a partir de vestigios embrionarios, procedentes de sistemas mullerianos secundarios que sufren involución parcial al disminuir las hormonas esteroideas después del parto o bajo el influjo de la substancia inhibidora mulleriana (5).

Se ha invocado también la existencia de una predisposición genética pues se ha observado una mayor incidencia en familiares de primer grado de quienes la padecen (15). También es más frecuente en pacientes con ciclos menstruales cortos (< 27 días) y con sangrados prolongados (> 7 días). El incremento en las concentraciones séricas de estrógenos contribuyen a su aparición; el embarazo, el tabaquismo, los anticonceptivos orales y el ejercicio físico con inicio a edades muy tempranas parecen ejercer un efecto protector (7).

Alteraciones inmunológicas y modificaciones en el medio peritoneal se han propuesto como factores condicionantes, pues se han observado alteraciones en la inmunidad mediada por células y en la inmunidad humoral, en monos rhesus y mujeres con endometriosis; el desbalance indicado facilita, en forma hipotética, la implantación de focos de endometriosis (8, 9).

## EPIDEMIOLOGIA

Dentro de la pelvis, las localizaciones más frecuentes en forma descendente son: ovarios (55%), ligamento ancho (35%), fondo de saco anterior (35%), fondo de saco posterior (34%) y ligamentos úterosacros (28%).

La incidencia de la endometriosis es difícil de precisar ya que muchas pacientes cursan asintomáticas. En la actualidad, la incidencia ha aumentado con el uso liberal de la laparoscopia. En 1987, Houston y Cols., informaron una incidencia de endometriosis pélvica de 108.8 a 246.9/100,000 nuevos casos/año en sujetos con riesgo.

Los estudios clínicos muestran que el diagnóstico de endometriosis se puede basar en la observación quirúrgica de la enfermedad. Este criterio ha resultado ser un obstáculo significativo para determinar la verdadera prevalencia de este padecimiento pues no es posible realizar un estudio al azar por medio de laparoscopias. Sin embargo, esto puede evaluarse por medio de una revisión de los ingresos hospitalarios. Usando estos datos, reunidos por el Registro Nacional de Estadísticas de Salud entre los Hospitales de los Estados Unidos de Norteamérica, Cramer encontró que la endometriosis motivó 5 de cada 1,000 ingresos hospitalarios en mujeres en edad reproductiva.

La prevalencia varía con la edad. Entre mujeres de 15 a 44 años de edad, la endometriosis se citó en 45 de cada 1,000 admisiones. En el grupo de 45 a 65 años de edad, la prevalencia fue de 31 casos por cada 1,000 admisiones. No se encontraron admisiones en mujeres menores de 15 años o mayores de 65, edades en las que la producción de estrógenos es relativamente baja.

Con el análisis de estos datos y otros, revelados por una serie en el Baylor School of Medicine y una revisión conducida por la U.S. Army en mujeres sometidas a cirugía abdominal, se concluye que la prevalencia de la enfermedad en mujeres entre 15 y 45 años de edad es de 1 a 7% con una incidencia del 5% (10, 11, 12).

El riesgo de la endometriosis se incrementa con la edad y va desde los 15 hasta los 49 años. Esto reviste gran importancia ya que se ha relacionado con la esterilidad femenina, hasta en un 10% como causa única y 30% de las mujeres con endometriosis son estériles. Se desconoce si esto es la causa o el efecto.

Cuando existen cicatrices extensas o endometriosis grandes, la esterilidad puede atribuirse a distocias anatómicas.

Sin embargo, la endometriosis menos grave sólo se vincula, con relación a la fecundidad, a causa de la alteración en la contractilidad muscular tubaria por incremento de

prostaglandinas en el líquido peritoneal, defectos de la fase lútea, aborto espontáneo y síndrome de folículo luteinizado no roto (13, 14).

### **MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Existen varias técnicas utilizadas para el diagnóstico de la endometriosis, las cuales pueden clasificarse en tres categorías:

- a) inmunoensayo sérico,
- b) técnicas de imagen, y
- c) exámenes laparoscópicos.

#### **INMUNOENSAYO SERICO**

Este método consiste en la determinación por medio de anticuerpos monoclonales OC-125 del antígeno CA-125, que es un antígeno celular de superficie que se expresan en tejidos derivados del epitelio celómico, tales como el endometrio, endocervix, trompas de falopio, peritoneo, pleura y pericardio. Se encuentra presente en bajas concentraciones en suero de mujeres sanas y en concentraciones elevadas, en pacientes con carcinoma de



ovario y en aquellas con endometriosis avanzada (estadio III, IV), durante el periodo menstrual, no observando cambio en pacientes con endometriosis leve, tomando como valor único máximo 35 U/ml. En líquido peritoneal los valores de CA-125 son 10 veces mayores que en el plasma (15, 16, 17, 18, 19).

Recientemente en un estudio realizado por Konenck y Cois., se refiere una sensibilidad del CA-125 como marcador para endometriosis. Parece mayor en el término del ciclo menstrual y durante la menstruación (20).

El CA-125 no puede ser usado como diagnóstico de endometriosis pélvica superficial. Sin embargo, en el diagnóstico de endometriosis e infiltración profunda de endometrio, la sensibilidad es de 36% y 24%, con una especificidad del 87% y 97% obtenidas con concentraciones límites de 25 y 35 UI/ml., respectivamente (21).

#### INTERLEUCINAS.

Las linfocinas juegan un importante papel en la infertilidad asociada a endometriosis. Las linfocinas son sustancias que regulan la proliferación y la diferenciación de los linfocitos. Son productos protéicos de muy diversas poblaciones celulares.

Los niveles de interleucinas son más elevados en pacientes con endometriosis que en aquellas pacientes controles; se sugiere que éstas tienen un efecto potencial no completamente definido en la fisiología reproductiva en pacientes con endometriosis (22).

La interleucina 1 estimula la liberación de fibroblastos, depósitos de colágena y formación de fibrinógeno (23). Fakh y Cois., proponen que niveles elevados de interleucina 1 pueden explicar la ocurrencia de fibrosis y la formación de adherencias que se asocian a los estados avanzados de endometriosis (24).

Existen reportes donde se argumenta que la tasa de producción de interleucina 1 difiere entre individuos con y sin endometriosis; a su vez, los niveles de interleucina 5 e interleucina 6, en líquido peritoneal, tienden a elevarse en pacientes con endometriosis, esto no guarda relación con la clasificación por estadios de la AFS. Se desconoce aún si este incremento es la causa o el efecto de esta patología (25).

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Perinatología, S.S., fueron determinadas la IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral en líquido peritoneal, concluyéndose que la IL-1 y el TNF podrían resultar buenos marcadores en endometriosis temprana (estadio I), así mismo, que la determinación de IL-6 puede ser utilizada

para establecer la presencia de endometriosis en los estadios I y II, no encontrándose correlación entre las distintas citocinas en suero y líquido peritoneal (26).

Otro método es la hemaglutinación pasiva para detección de anticuerpos.

Estas pruebas no son suficientemente sensibles para ser utilizadas como pruebas de escrutinio.

#### TECNICAS DE IMAGEN.

Hasta hace poco tiempo, las técnicas de imagen fueron de poco valor en el diagnóstico de endometriosis.

El papel que juega la exploración ultrasonográfica en limitado en la exploración de endometriosis de ovario, ya que la apariencia de una estructura ecogénicamente quística es patognomónica.

La ultrasonografía no es actualmente de utilidad en la identificación de implantes focales, ya que su sensibilidad es del 11% (27).

En contraste, la resonancia magnética nuclear ha demostrado su valor en el diagnóstico de endometriosis.

En un estudio reciente limitado a mujeres con masas anexiales, la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo de la resonancia magnética es superior a otras técnicas de imagen para el diagnóstico de endometriosis. Sin embargo,

posee diversas limitaciones y la presencia de endometriosis en este estudio no es patognomónica (28, 29).

La histerosalpingografía tiene poco valor diagnóstico en la endometriosis.

#### LAPAROSCOPIA.

La laparoscopia es de gran ayuda en el diagnóstico de endometriosis ya que permite la visualización directa de la lesión, amplifica las lesiones varias veces su tamaño, permite la confirmación histológica mediante la toma de biopsia - sobre todo en aquellos casos en que las lesiones son mínimas o no patognomónicas de la endometriosis.

La grabación con equipo de videofilmación puede ser de gran valor para documentar los hallazgos y en los cuidados posteriores del paciente.

Por otra parte el estudio laparoscópico permite realizar una adecuada clasificación de la endometriosis en estadios I al IV, de acuerdo a los criterios establecidos por la Asociación Americana de Fertilidad (30, 31, 32) (Cuadro 1).

Este método posee una especificidad del 90%. Debe tomarse en cuenta la apariencia heterogénea de las lesiones de endometriosis, que hace que la precisión del diagnóstico dependa en gran medida de la habilidad del médico para reconocer la enfermedad (33, 34). Por ejemplo, en un

estudio realizado en el Instituto Nacional de Perinatología, S.S., donde se evaluó la capacidad y la correlación histológica de la endometriosis, se determinó la experiencia del cirujano y la repercusión en el diagnóstico de la enfermedad por medio de videofilmaciones que fueron evaluadas por médicos residentes de ginecología y obstetricia, de 4to. y 5to. año de Biología de la Reproducción Humana, por un médico adscrito y por el jefe de la unidad de reproducción asistida. Se encontró una sensibilidad del 68.4%, especificidad del 73.1%, valor predictivo positivo de 70.3% y negativo de 72.1%, con una confiabilidad de 70.9%. Esto nos muestra que en el 31.6% de los casos no se hizo el diagnóstico y en 26.9% el diagnóstico fué erróneo; así mismo, que la capacidad para detectar la endometriosis aumenta con la experiencia del cirujano ya que la evaluación hecha por el jefe de servicio dió una tasa de confirmación de 76.1% con una especificidad del 95.8% (35).

La laparoscopia es en la actualidad el método más utilizado para el diagnóstico de la endometriosis, sin embargo, no representa un procedimiento idóneo pues además de poseer contraindicaciones absolutas y relativas, es un método invasivo no exento de complicaciones, que conlleva riesgo anestésico, costo elevado, es poco accesible en todos los niveles hospitalarios y requiere de equipo especial y

personal capacitado para su uso. Es por esto que se buscan métodos más sencillos, económicos, confiables y con bajo riesgo para el diagnóstico de endometriosis sin lograrse hasta la fecha.

En la actualidad, con el descubrimiento de las moléculas de adhesión celular, se sugiere que éstas están involucradas en la patogénesis de la endometriosis por lo que decidimos analizar las ICAM y VCAM y determinar su relación con la presencia o no presencia de la endometriosis.

### **MOLECULAS DE ADHESION**

Las integrinas son alfa beta heterodímeros. La subunidad alfa varía en tamaño, entre 120-800kd y están unidas con la subunidad beta en forma no covalente (90-110 kd). La mayoría de las integrinas se expresan sobre una amplia variedad de células y la mayor parte de las células expresan diversas integrinas.

En la actualidad se conocen más de 20 heterodímeros de integrinas, que se componen de al menos una de las catorce cadenas alfa y de una de ocho de las cadenas beta (36, 37).

Muchas subunidades alfa solo pueden asociarse con una subunidad beta. Sin embargo, diversas subunidades alfa (alfa4, alfa6, alfa5) pueden asociarse con más de una subunidad beta.

Las integrinas parecen ser el mejor receptor por el cual las células se unen a la matriz extracelular y algunas integrinas, median importantes eventos de adhesión célula-célula.

El mayor número de cadenas de integrinas son miembros de la subfamilia de las beta 1, también conocida como antígeno de activación muy tardío (VLA).

La familia de las integrinas beta 1, con cadenas alfa de alfa 1 a alfa 6 sirven como receptores para proteínas de la matriz celular como laminina (alfa 1 a 3, alfa 6), fibronectina (alfa 3 a 5) y colágeno tipo IV (alfa 1 a 3) (38, 39).

Se han realizado muchos progresos para definir el sitio de reconocimiento de las integrinas en los ligandos y receptores. El primer sitio de unión definido fue la secuencia arg-gly-asp (RGD) presente en fibronectina vitronectina y una variedad de otras moléculas adhesivas. Es reconocido por diversas integrinas (alfa 5 beta 1, alfa 1 beta 3 y la mayoría de las integrinas alfa V beta) pero no por otras. La alfa 1 beta reconoce además la secuencia lys-gln-ala-gly-asp-val (KQAGDV) en el fibrinógeno. Otras integrinas reconocen diversas secuencias: alfa 2 beta 1 une asp-gly-

glu-ala (DGEA) en la colágena tipo I; alfa 4 beta 1 une glu-leu-leu-asp-val (EILDV) en un segmento de empalme alternativo de fibronectina; y se ha reportado en forma reciente que alfa X beta 2 une gly-pro-arg-pro (GPRP) en el fibrinógeno.

Otros sitios de unión aún no se definen con precisión, aunque los diversos receptores de laminina reconocen partes específicas de la molécula de laminina y aquellas integrinas que unen los contrarreceptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas reconocen dominios específicos, semejantes a inmunoglobulinas (40, 41).

Las dos subunidades de integrinas, son glicoproteínas transmembrana, cada una con un segmento hidrofóbico transmembrana.

En la mayoría de las integrinas los dominios citoplasmáticos son cortos (50 aminoácidos o menos). Beta 4 es una excepción: su dominio citoplasmático incluye sobre 1,000 aminoácidos. Los dominios extracelulares (>75 kd para subunidad beta y >100 kd para subunidad alfa) se asocian para formar heterodímeros.

La imagen de las integrinas observadas al microscopio electrónico muestran una cabeza globular, aparentemente incluyendo parte de ambas subunidades y dos tallos que se extienden a la bicapa de lípidos (42, 43).



Ambas subunidades contienen extensas uniones disulfuro y son muy resistentes ala proteolisis en células intactas. Las subunidades beta se caracterizan por cuatro enlaces repetidos de segmentos ricos en cistina y se cree que están unidos internamente a los puentes disulfuro.

El N terminal 40-50 kd, se enlaza fuertemente con un anillo disulfuro interno y contribuye a la unión del ligando en el dominio.

Todas las subunidades alfa contienen 7 enlaces repetidos de un segmento homólogo: los últimos 3 o 4 de éstos contienen secuencias repetidas (asp-x-asp-x-asp-gly-x-x-asp o secuencias relacionadas) que probablemente contribuyen a las propiedades divalentes de la unión al catión de estas subunidades.

Las propiedades divalentes son esenciales para la función del receptor (44, 45, 46).

Cada integrina con su dominio terminal de la subunidad alfa y beta se combinan para formar una cabeza que une el ligando. Esta cabeza se conecta a todo lo ancho de la membrana celular por dos tallos, cada uno hecho de las dos subunidades y estas a su vez a los dos dominios citoplasmáticos. Estos dominios citoplasmáticos se cree que interactúan con las proteínas del citoesqueleto y guían a otros componentes citoplasmáticos.

Se ha observado que una función principal de las integrinas es el de mediar la interacción del citoesqueleto en la cara interior de la membrana, en sitios de sustrato celular o adhesión de célula a célula. Esto posiblemente hace que las integrinas puedan transmitir otros signos transmembrana y de como la ocupación de ligandos extracelulares se unen a eventos intracelulares.

Amat en una publicación reciente, mencionó que las integrinas beta 2 que se expresan sobre los leucocitos presentan un fenómeno de activación que es requerido para la expresión de varias actividades de unión a ligandos de las integrinas beta 2. Esta activación se acompaña de un cambio conformacional (47).

El estímulo efectivo para la activación de las integrinas beta 2, varía dependiendo del tipo de célula a la que regulan internamente y modulan el comportamiento celular por medio de la matriz extracelular.

Se ha observado en el endometrio humano que las integrinas que se expresan en forma primaria sobre las células epiteliales y glandulares son: alfa 2, 3 y 6 (receptores para colágena/laminina), mientras que en las células del estroma predominan las alfa 5 (receptor de fibronectina).

La presencia de alfa 1 sobre el epitelio glandular es de ciclo específico, encontrándose sólo en la fase secretora del ciclo

endometrial; se han encontrado también cambios en la expresión de las unidades del receptor de vitronectina alfa 5 beta 3, en células epiteliales durante el ciclo.

La alfa 5 se incrementó durante el ciclo, mientras que la subunidad beta 3 apareció abruptamente en el día 20 del ciclo sobre las células epiteliales glandulares; en pacientes con desfase de la fase lútea, se observó un retraso en la aparición de las integrinas beta 3, esta interrupción en la expresión de la aparición de las integrinas podría asociarse con una disminución en la receptividad endometrial (48, 49).

Como se expuso anteriormente, aún no está claro el mecanismo por el cual el tejido endometrial se une al peritoneo en la endometriosis. Esta unión es posible que se lleve a cabo por medio de las integrinas.

Linden y Cois, en un estudio realizado sobre la expresión de las integrinas en células de sangrado menstrual, endometrio, líquido peritoneal, peritoneo y endometriosis, observó que las integrinas alfa 2 beta 1, alfa 3 beta 1, alfa 4 beta 1, alfa 5 beta 1, se expresan en tejido endometriósico y en células de tejido potencialmente involucrado en el desarrollo de la endometriosis. También encontró que las integrinas alfa 4 beta 1 no se expresan en células epiteliales de pacientes sin

endometriosis, pero estuvieron presentes en 2 de 8 pacientes con endometriosis (50, 51).

Las moléculas de adhesión que están dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas como ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1 que median la unión célula-célula se encuentran presentes en una gran variedad de células como fibroblastos, células epiteliales, endoteliales, etc.

Las ICAM-1 poseen un tamaño que oscila entre 90 y 115 KDa y se expresan en las células T y B, células endoteliales, queratinocitos, condrocitos y fibroblastos; son importantes en la agregación de monocitos, linfocitos y neutrófilos en el endotelio activado, durante la activación, pavimentación y extravasación, 12 a 24 horas después de iniciado el proceso inflamatorio inducido por citocinas tales como IL-1, IL-4 y TNF. Su ligando LFA-1 (que es una integrina), al activarse detiene a los leucocitos circulantes y los une con firmeza al endotelio vascular; esta interacción LFA-1:ICAM-1 probablemente esté relacionada con la diapédesis de los leucocitos.

Las VCAM-1 poseen un tamaño de 90 a 110 Kda; se expresan en células endoteliales, macrófagos, células dendríticas, médula ósea, fibroblastos y mioblastos; median también la adhesión de linfocitos, monocitos y eosinófilos en el endotelio activado durante la activación, pavimentación y

extravasación 6 a 10 horas posteriores al inicio del proceso inflamatorio y su ligando es la integrina VLA-4 (alfa 4, beta 7) que se expresa en mioblastos, timocitos, linfocitos y monocitos.

Estas moléculas de adhesión están relacionadas con diversas enfermedades crónicas y la endometriosis quizás no sea la excepción (52, 53, 54, 55).

Peritoneo	Endometriosis	1 cm	1-3 cm	3 cm
	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
Ovario	D Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
	I Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
Obliteración de fondo de saco posterior		Parcial		Completo
		4		40
Ovario	Adherencias	Ocluyen 1/3	Ocluyen 1/3-2/3	Ocluyen 2/3
	D Laxas	1	2	4
	Densas	4	8	16
	I Laxas	1	2	4
	Densas	4	8	16
	Trompas	D Laxas	1	2
Densas		4*	8*	16
I Laxas		1	2	4
Densas		4*	8*	16

\*Si el extremo fimbriado de la trompa de falopio está totalmente cerrado, cambiar el puntaje a 16.

Endometriosis adicional _____	Patología asociada _____
Para ser usado con trompas y ovarios normales	Para ser usado con trompas y/u ovarios anormales
I _____ D I _____	D _____

CUADRO 1

## **RAZONES PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACION.**

La historia natural de la endometriosis incluye al menos dos fases distintas. En la primera y que incluye las fases clínicas o subclínicas iniciales, predominan los fenómenos inflamatorios caracterizados por reclutamiento y extravasación de leucocitos, fagocitosis, neovascularización, etc. Todos estos eventos giran alrededor del reconocimiento de receptores específicos en las células endoteliales por parte de los leucocitos, mediados por moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, etc.) asociadas a membrana o solubles.

Con estos antecedentes es posible proponer que las fases iniciales de la endometriosis puedan ser distinguidas de las tardías y de la normalidad a través de la cuantificación de CAMs en líquido peritoneal.

Hasta el momento existen sólo algunos estudios encaminados a caracterizar las modificaciones en el microambiente peritoneal a lo largo de la evolución clínica de la endometriosis. Esta enfermedad se caracteriza por implantes peritoneales de endometrio, con eventos inflamatorios que progresan al establecimiento de eventos fibrogénicos con deformación de las estructuras locales. El objeto de este

estudio es el análisis exploratorio de la utilidad de diferentes marcadores del proceso de adhesión celular durante el proceso inflamatorio en líquido peritoneal, así como contrastar su presencia con líquido peritoneal de mujeres sin endometriosis.



**DEFINICION DE LOS OBJETIVOS.**

Comparar los niveles de moléculas de adhesión solubles en líquidos peritoneales de mujeres con y sin endometriosis.

### **FORMULACION DE LA HIPOTESIS.**

Las concentraciones de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 solubles en líquido peritoneal, permitirán distinguir a aquellas pacientes con endometriosis.

## **MATERIAL Y METODO.**

Universo: mujeres en estudio por esterilidad sometidas a laparoscopia diagnóstica.

Muestra: líquido peritoneal de mujeres con diagnóstico clínico y laparoscópico de endometriosis y mujeres sin endometriosis.

Selección de pacientes y toma de productos biológicos. Se estudiaron pacientes en estudio por esterilidad en el Instituto Nacional de Perinatología, S.S. sometidas a laparoscopia diagnóstica. Los criterios de inclusión para conformar los grupos de endometriosis y esterilidad de causa no identificada se ajustaron a lo siguiente:

1. pacientes que aceptaron su inclusión en el estudio con consentimiento escrito.
2. En las que se realizó procedimiento quirúrgico completo, con toma de biopsia y registro videolaparoscópico.
3. En las que se determinó la presencia o ausencia de lesiones de endometriosis peritoneal por laparoscopia y la evaluación del diagnóstico fue coincidente cuando fue evaluada en el

video por al menos tres médicos especialistas. El estadio de evolución de la endometriosis fué calificado de manera independiente y ciega de acuerdo al criterio del American Fertility Society (11).

4. En las que el diagnóstico de endometriosis se confirmó en código cerrado al patólogo por histopatología de las biopsias de las lesiones sugerentes de endometriosis por laparoscopia.

5. En las que se pudo obtener muestra de líquido peritoneal sin contaminación con sangre.

#### Descripción de toma de muestra.

Previa exploración bimanual de la pelvis baja, anestesia general, asepsia y antisepsia de la región abdominal, pubis y cavidad vaginal, se colocan campos estériles, posterior a los cual se colocan las pinzas de pozzi en el labio anterior del cervix y cánula endocervical de jorcho que se fija con la pinza de pozzi. Mediante incisión periumbilical se introduce la pinza de verres en cavidad abdominal y con la paciente en posición de trendelenburg se instila dióxido de carbono dentro de la cavidad para producir neumoperitoneo manteniendo una presión intraabdominal menor a 15 mmHg; posteriormente se introduce trocar a través de la

incisión periumbilical, traccionando la pared abdominal, con dirección a la pelvis y manteniendo el útero en posición posterior. Se introduce el telescopio y se visualiza la cavidad pélvica y los órganos contenidos en ella. Se realiza una segunda punción con colocación de trocar accesorio con visualización directa a través del laparoscopio. Se introduce el aspirador y manteniendo el útero en posición anterior se aspira el líquido peritoneal asentado en el fondo de saco posterior llenando a depositarse a una jeringa estéril de 20 cm. colocada en el orificio externo del aspirador. El líquido peritoneal colectado se transfiere a un tubo de ensayo estéril y previamente rotulado con nombre de la paciente y registro, se tapa y es enviado de inmediato al laboratorio de bioquímica para su proceso

#### Procesamiento de líquidos peritoneales.

A cada muestra se le asignó un número código a su llegada al laboratorio y el diagnóstico permaneció cegado a los operadores de todos los procedimientos que se describen a continuación. Cada muestra fue separada en alícuotas que fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Antes de cada procedimiento a cada muestra se le realizó determinación de concentración de proteína con el método colorimétrico de Bradford (56).

Con objeto de determinar la presencia de diferentes moléculas de adhesión celular en el líquido peritoneal se seleccionaron 8 muestras en las que se abrió el código de modo de saber que se trataba de 4 muestras con endometriosis y un número similar sin ella. Esta primera fase sólo sirvió para determinar de modo específico cual de las distintas moléculas de adhesión estaba presente en el líquido peritoneal utilizando western blot o inmunotransferencia. Luego de identificar a éstas moléculas se cuantificó su concentración utilizando un método de ensayo inmunoenzimático (ELISA).

#### Inmunotransferencia.

Los líquidos peritoneales seleccionados fueron procesados para detectar la presencia de las siguientes moléculas de adhesión celular:

1. ICAM-1
2. VCAM-1
3. E-selectina
4. VLA-4 activada
5. LFA-1 activada
6. CD 31
7. CD 44.

La lista anterior se conformó tomando en cuenta a las moléculas que pudieran actuar como marcadores solubles del evento inflamatorio que caracteriza a la endometriosis. Alicuotas de los líquidos seleccionados conteniendo 30 microgramos de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en un sistema discontinuo con gel concentrador al 4.5% y separador al 10%. Todos los geles fueron corridos a 10 mA de corriente constante por alrededor de 1 hora. Las proteínas separadas en los geles fueron transferidas electroforéticamente a membranas Immobilon-P (Millipore, USA) utilizando un sistema de transferencia semiseca (BioRad, Bedford MA). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% y la presencia de cada una de las moléculas de adhesión celular mencionadas fué revelada con el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada una de ellas:

1. ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina. Donadas por RD Systems, USA.
2. VLA-4 a y LFA-1. Donadas por el Dr. Bruce Lessey, Universidad de Pennsylvania.
3. CD31 y CD44, Donadas por Becton Dickinson, USA.

La detección del complejo de anticuerpo primario y molécula de adhesión celular se realizó utilizando un sistema con segundo anticuerpo biotinilado y complejos avidina-peroxidasa (Vector, USA). Como sustrato cromogénico se utilizó diaminobenzidina. Se tomó registro fotográfico de cada membrana procesada y fueron sometidas a análisis densitométrico con objeto de comparar cuantitativamente los resultados.



Esquema de Western Blot.

Electroforesis de proteínas de líquidos peritoneales

Transferencia semiseca de proteínas separadas a  
membranas Inmobilon-P



Bloqueo de membrana



Agregado de anticuerpo monoclonal dirigido contra  
moléculas de adhesión celular



Lavado



Agregado de anticuerpo secundario anti-monoclonal  
(conejo anti-ratón)



Lavado



Agregado del sustrato cromogénico. Desarrollo de color



Registro de resultados.

#### ELISA de VCAM-1 e ICAM-1.

La concentración de estas dos moléculas de adhesión en todos los líquidos peritoneales capturados se cuantificó en ELISA separados. Los dos ELISA son similares ya que utilizan un sistema de "sandwich" en el que un anticuerpo monoclonal se encuentra inmovilizado en la fase sólida y luego se agrega un anticuerpo policlonal preparado en conejo que reconoce a la molécula pegada al anticuerpo primario, después se agrega un tercer anticuerpo marcado con peroxidasa que reconoce a la inmunoglobulina de conejo. Estos sistemas los tiene disponibles la compañía Genzyme (Boston, MA). El desarrollo de color se cuantifica en un espectrofotómetro (Eliómetro Dynatech, USA). Las lecturas se corrigen para las diluciones utilizadas y se expresa la cantidad de cada molécula en ng/ml.

### Esquema de ELISA.

Agregar muestra diluida en los pozos conteniendo anticuerpo monoclonal inmovilizado



Lavar



Agregar anticuerpo policlonal dirigido contra VCAM o ICAM preparado en conejo



Lavar



Agregar anticuerpo policlonal anticonejo marcado con peroxidasa. Reconoce al complejo monoclonal-CAM-anticuerpo policlonal



Lavar



Agregar sustrato cromogénico y desarrollo de color



Cuantificar desarrollo de color en Elisómetro.

## **RESULTADOS.**

Los métodos para evaluar la endometriosis por laparoscopia y confirmación por biopsia utilizados en este estudio han sido previamente estandarizados en el área de Clínica de Esterilidad y Unidad de Reproducción Asistida del INPer.

En este estudio prospectivo, transversal, de casos y controles se incluyeron veinticinco pacientes estériles: catorce pacientes con diagnóstico de endometriosis y once con esterilidad de causa no identificada sin endometriosis. La edad promedio de las pacientes del grupo A (endometriosis) fue de 30.7 años con rangos de 24 a 35 años y del grupo B (ECNI) fue de 28.3 con un rango de 22 a 34 años de edad. El inicio de la menarca fue de los 11 a los 13 años no existiendo diferencia significativa entre ambos grupos. Con respecto al cuadro clínico, en el grupo A: 2 pacientes cursaron con dismenorrea y dispareunia mientras que el resto de las pacientes no presentaron estos síntomas. Todas las pacientes presentaron ciclos regulares con excepción de una paciente del grupo A con periodos de opsomenorrea. Todas las pacientes con diagnóstico de endometriosis por laparoscopia presentaron lesiones localizadas en fondo de saco posterior y en útero-sacros. El estudio histopatológico de la biopsia de las

lesiones reportó tejido fibrovascular con glándulas endometriales compatibles con endometriosis. De acuerdo a la clasificación de la American Fertility Society las pacientes correspondían a estadios I: 5 casos, estadio II: 4 casos y estadio III: 4 casos. Se efectuaron 44 evaluaciones a través de videolaparoscopia por médicos adscritos del Instituto Nacional de Perinatología, S.S., evaluándose una certeza diagnóstica de 91.33% (Cuadros 2 y 3).

Fue posible determinar la presencia de ICAM-1 y VCAM-1 por western blot en todas las muestras provenientes de casos con endometriosis y solo en uno de los casos sin endometriosis seleccionados fue posible identificar bandas inmunorreactivas equivalentes pero de mucho menor intensidad (FIG. 1 y 2). El análisis densitométrico de estas bandas reveló que la intensidad de ICAM-1 en la muestra sin endometriosis es de aproximadamente 20% de la presente en muestras con endometriosis. En tanto que para la VCAM-1 el resultado equivalente correspondió a 30%. Dado que solo se analizaron 4 muestras de cada grupo no fue posible hacer ninguna comparación más extensa de estos datos y los resultados se limitaron a ser directivos de los ELISA que se usaron después. Ninguna otra de las moléculas de adhesión se detectó en las muestras de líquido peritoneal.

La cuantificación de CAMs por ELISA se muestra en las tablas 1 y 2 en las que se correlaciona la cuantificación con el estadio clínico de las muestras.

Tanto ICAM-1 como VCAM-1 solubles en líquido peritoneal están en mayor concentración en mayor concentración en los casos de endometriosis temprana en comparación con los casos tardíos ( $P < 0.01$ ) y son completamente diferentes de los casos sin endometriosis ( $P < 0.001$ ).

PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS

ENDOMETRIOSIS I		ICAM Ng/ml	VCAM Ng/ml
CASO	1	37.23	12.7
	2	21.63	8.5
	3	51.0	15.1
	4	18.6	13.7
	5	42.7	8.9
	6	63.1	13.1
	7	17.7	8.7
ENDOMETRIOSIS II			
CASO	1	17.3	10.3
	2	15.8	8.1
	3	38.4	14.3
ENDOMETRIOSIS III/IV			
CASO	1	7.6	3.7
	2	6.7	1.6
	3	3.1	4.0
	4	6.8	5.2

VCAM ESTADIO I/II = P menor que 0.01  
 VCAM ESTADIO I/III-IV= P menor que 0.001

CONTROLES SIN ENDOMETRIOSIS

CASO	ICAM Ng/ml	VCAM Ng/ml
1. Mioma	7.8	5.0
2. Pelvis normal	10.1	1.3
3. OTB Qx	14.7	3.7
4. Adherencias	7.2	4.1
5. EPI	28.7	3.1
6. Pelvis normal	15.8	3.1
7. Adherencias	9.1	4.7
8. Pelvis normal	5.3	5.6
9. OTB	7.6	6.0
10. Adherencias	8.0	7.1
11. Adherencias	6.5	6.3

EPI = Enfermedad Pélvica Inflamatoria  
 OTB = Oclusión Tubaria Bilateral  
 Valor de P = Menor de 0.001



FIG. # 1 ICAM

FIG. # 2 VCM



## **DISCUSION**

Los criterios diagnósticos para establecer la presencia y estadio clínico de la endometriosis son aún ineficientes, poseyendo diversas limitaciones por la dificultad para llegar a un diagnóstico confiable, por su baja especificidad y sensibilidad, por ser un método invasivo.

Por el momento, el método más confiable para establecer el diagnóstico de endometriosis es la laparoscopia con toma de biopsia de las lesiones y confirmación histopatológica, no accesible en nuestro medio a la mayoría de la población pues se requiere de un equipo costoso y cirujanos entrenados para su uso, anestesiólogos familiarizados con el procedimiento ya que conlleva riesgos adicionales por el uso de CO<sub>2</sub> y el aumento de la presión en la cavidad abdominal, así como un equipo técnico para su buen funcionamiento y conservación, hecho que eleva aún más sus costos; por último, se presenta un alto índice de diagnósticos falso-negativos.

Es por lo anterior que diferentes autores se han dado a la tarea de investigar diferentes marcadores séricos que ofrezcan una alternativa en el diagnóstico de la endometriosis, con especificidad y sensibilidad igual o mejor

que las obtenidas por laparoscopia, más sencillos, menos invasivos y de uso más generalizado.

La búsqueda de estos marcadores, hasta la fecha, ha sido infructuosa y sólo destacan el uso del controvertido marcador CA-125 y la determinación de IL-1, IL-5, IL-6 y TNF, estas últimas todavía en fase de investigación para el diagnóstico de esta enfermedad.

En este estudio piloto hemos iniciado el análisis del posible uso de algunos marcadores contenidos en el líquido peritoneal (ICAM-1 y VCAM-1), como posibles indicadores de la presencia o ausencia de endometriosis ya que de encontrar una buena correlación entre la clasificación por estadios y los niveles de estas moléculas de adhesión en el líquido peritoneal, sería de gran ayuda pues evitaría la laparoscopia y la substituiría por una culdosentesis para la obtención de líquido peritoneal a fin de diagnosticar la enfermedad, procesamiento más práctico, de bajo riesgo y más económico.

En investigaciones futuras se podrían buscar estos marcadores de endometriosis en otros fluidos corporales como suero, saliva, lágrimas, moco cervical, etc. como muestras alternativas para obtener el diagnóstico, creando nuevas técnicas de uso más general a bajo costo como la hemaglutinación o la prueba de latex que son microesferas a

las que se agregaría a su superficie anticuerpos contra los dominios de ICAM-1 o VCAM-1 aglutinándose en caso de encontrarse estas moléculas, o bien por el método de ELISA. En los resultados obtenidos podemos observar, como los niveles de ICAM y VCAM, disminuyen conforme el estadio de la endometriosis es mayor, es decir, guarda una relación inversamente proporcional al grado de endometriosis; que existe una diferencia significativa de ICAM y VCAM, en estadio I, en comparación con el estadio II de endometriosis ( $P < 0.001$ ) y una diferencia aún mayor, entre los estadios I y los estadios III y IV; una diferencia también significativa cuando se comparo el grupo de pacientes con y sin endometriosis ( $P < 0.001$ ) y los valores de ICAM y VCAM entre los pacientes con estadios avanzados de endometriosis y sin endometriosis, fueron similares.

De acuerdo a los resultados anteriores, podemos inferir, que la determinación de ICAM y VCAM, sirven para la detección de estadios tempranos de la endometriosis y podría usarse como escrutinio y/o como parte del protocolo en el estudio de la paciente estéril, ya que los estadios tempranos de esta enfermedad son los que se presentan en forma más frecuente. Sin embargo son necesarios estudios con muestras mayores para validar el método.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Merrill J A, Nelson J H, Dolan T E. : Lesions of the ovary. 3a ed. Hageritown: Danforth D N, 1977: 978.
2. Bodawy S Z A, et al.: Autoimmune phenomeno in infertile patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 271.
3. Rosenfeld D L, Lechner D B.: Endometriosis in a patient with rakitansky kuitter hauser. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 139: 105.
4. H W Jones III, A C Wentz, I S Burnett.: *Tratado de Ginecologia de Novak.* 11a. ed. México: Interamericana Mc Graw-Hill, 1991:266.
5. Takahashi M, Hayashi M, Mangoramo T F, et al.: The ontogeny of mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod.* 1986: 35; 447.
6. Simpson J L, Elias S, Malinak L R, et al.: Heritable aspects of endometriosis: Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 137:327.

7. Ricardo Pau Ferrari.: Avances en endometriosis. Revista Latinoamericana de Esterilidad y Fertilidad. 1991, 5(2): 65
8. Norbet Gleicher M D, Albert El-Roely, Edmon Confino and Jan Frieberg.: Is endometriosis an immune disease?. Obstet Gynecol. 1987; 70(1): 115.
9. W P Dmowski , Rusell W Steele, Glen F Baker.: Deficient cellular inmunity in endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 1981; 141(4): 381.
10. Robert L Barbieri.: Etiology and epidemiology of endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 1990; 162(2): 565.
11. Cramer D W.: The epidemiology of endometriosis. New York: Wilson E A, 1990: 15.
12. Matorras R., Rodriguez F., Pijoan J.I., Ramon O., Gutierrez de Tran G., Rodriguez-Escudero F.: Epidemiology of endometriosis in infertile women. Fertil Steril. 1995; 63:34-8

13. W. Paul Dmowsky, Ramaa Rao, Scomegria A.: The luteinized unruptured follicle syndrome and endometriosis. *Fertil Steril* 1980; 33(1):30.

14. Yamiyuky Mio, Toshiko todo, Tasuku Harado.: Luteinized unrupture follicle in the early stages on endometriosis is a cause of unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167(1):273.

15. Moen M.H., Hagen B. and Onsrud M.: CA-125 in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 1991;6(10):1400.

16. Pittaway D.E., Fayez J.A.: The use of CA-125 in the diagnosis and management of endometriosis. *Fertil Steril* 1986;45: 790.

17. Timur Gurgan, Husnli Kisnisci, Hakan Yarali, Tarik Aksu, Hutusi Zeynelugla, Osman Develloglu.: Serum and peritoneal fluid CA-125 levels in early stage endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 1990;30:105.

18. Barbieri R.L., Niloff J.M., Bast R. C. Jr., Scaetzi E., Kistner R. W., Knapp R.C.: Elevated serum concentrations of CA-125

in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1986;45:630.

19. Hornstein, Harlow BL, Thomas PP and Check JH: Use of a new CA-125 assay in the diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod*. 1995;10(4):932-34.

20. Pittaway DE, Feyes JA: Serum CA-125 antigen levels increase during menses. *Am J Obstet Gynecol*. 1987; 156:75.

21. Philippe R., Konincky, Leena Rittinen M. Sc., Markku Seppala, Freddy J. Cornillie.: CA-125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis. *Fertil-Steril*. 1992; 57:3.

22. Taketani Y., Kuo TM., Mitzuno M Comparison of cytokine levels and embarazo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167(1):265

23. Lars Ronnberg.: Endometriosis and infertility. *Annals of medicine* 1990; 22:91.



24. Hasan Fakh, Billy Baggett, Gary Holtz, Kwong-Yok Tsang, John C.Lee, H Oliver Williamson. Interleukin 1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil-Steril* 1987;47(2):213

25. Koyama N., Matsuura and Okamura H. Cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Int J Gynecol Obstet.* 1993; 43: 45-50

26. Determinacion de interleucinas en liquido peritoneal de pacientes con endometriosis. Dr. Perez Ocharan, en: Tesis; Cap. Conclusiones. INPer. S.S., Mexico, 1994. pp. 36-39.

27. Friedman H., Vogelzang R.L., Mendelson E.B., Neiman H.L., Cohen M. Endometriosis detection by US with laparoscopic correlation. *Radiology.* 1985; 57:217.

28. Arrivel, Hricak H., Martin M.C.: Pelvic endometriosis. MR. imaging *Radiology.* 1989;171:687.

29. Togachi K., Nishimura K., Kimura I, et al.: Endometrial Cysts: diagnosis with MR., *Imaging Radiology* 1991;180-73

30. Endometriosis and infertility, Leon Speroff, en : Clinical Gynecologic endocrinology and infertility, Leon Speroff; cap 18, Ed. Williams and Wilkins. Fourth edition. Baltimore USA, 1988. pp 547-563.

31. Evaluation and Treatment of the infertile Woman, R.C. Edwards, en: Assisted Human Reproduction, R.C. Edwards; cap. 6, Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia USA, 1995. pp. 195-232.

32. The American Fertility society.: Revised American Fertility Society classification for endometriosis. Fertil-Steril. 1985; 23: 351-352.

33. Stripling M.C., Martin D.C., Chatman D.L., Zwaag R. V., Poston W.M.: Subtle appearance of pelvic endometriosis. Fertil-Steril. 1988;49:427.

34. G. David Adamson MD: Diagnosis and clinical presentation of endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 1990; 162:568.

35. Mateo sanchez H., Bustos Lopez H., Kably Ambe A., Vadillo Ortega F., Nava Loya G., Coria Soto I., Alvarado Duran A.

Enviado para su publicacion a la revista de ginecologia y obstetricia de Mexico

36. Arnaout, Dana N., Gupta SK, Tenen DG and Fathallah DM. Point mutations impairing cell surface expression of the common B subunit (CD18) in a patient with leukocyte adhesion molecule (leu-CAM) deficiency. *J Clin Invest.* 1990; 85:977-81.

37. Rouslahti E. *Integrins.* 1991;87: 1-5.

38. Katz AM, Rosenthal D, Sauder DM. Cell adhesion molecules. Structure, function and implication in a variety of cutaneous and other pathologic conditions. *Int J Dermatol.* 1991;30:153-160.

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

40. Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, and Springer TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 1990;61:243-254.

41 Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, and Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*. 1991;65:961-971

42. Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, and Phillips DR. Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIA as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 1985; 260: 1743-1749.

43. Kelly T, Molony L, and Burridge K. Purification of two smooth muscle glycoproteins related to integrin. Distribution in cultured chicken embryo fibroblasts. *J Biol Chem*. 1987;262: 17189-17199.

44. Gailit J, and Ruoslahti E. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem*. 1988;263:12927-12933

45. Kirchhofer D, Gailit J, Ruoslahti E, Grzesiak J, and Pierschbacher MD. Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *J Biol Chem*. 1990; 265:18525-18530.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

59

46. Kirchhofer D, Grzesiak J and Pierschbacher M.D. Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem.* 1991;266:4471-4477

47. Arnaout M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood.* 1990;75:1037-1050.

48. Bruce A. Lessey, Laszlo Damjanovich, Christos Coutifaris, Arthur Castelbaum, Steven M. Albelda and Clayton A Buck Integrin adhesion molecules in the human endometrium. *J Clin Invest.* 1992;90:188-195.

49. Bruce a Lessey, Arthur J. Castelbaum, Stephen W. Sawin, Clayton A. Buck, Rita Schinnar, Warren Bilker and Brian L. Strom. *J Clin Endocrinol and metabolism.* 1994;79(2): 643-649.

50. Van der Linden, de Goetj, Dunselman, Van der Linden, Ramaekers, Evers. Expression of Integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil-Steril.* 1994;61(1):85-90.

51. Van der Linden, Goelj, Dunselman, Erkens and Evers. Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil-Steril* 1995;63(6):1210-1216.

52. Garcia-Gonzalez E., Swerlick R.A., Lawley T.J. Cell adhesion molecules. *Am J Dermatopathol.* 1990; 12(2): 188-192.

53. Lasky L.A. Lectin cell adhesion molecules (LEC-CAMs): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation. *J Cell Biochem.* 1991;45:139-146.

54. Piali L., Hammel P., Uherek C. et al. CD31 /PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol.* 1995;130(2): 451-460.

55. Arroyo A.G., Garcia Vicuna R., Marazuela M., Yednock T.A., Gonzalez-Amaro R., Sanchez-Madrid F. Expression and functional significance of an activation-dependent epitope of the beta 1 integrins in chronic inflammatory diseases. *Eur J Immunol.* 1995;25(6): 1720-1728.

56. Bradford M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An Biochem.* 1976;72: 248-254.