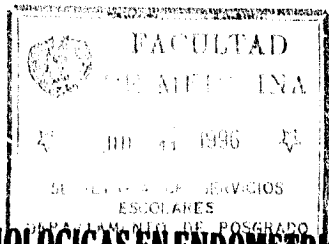


11204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



2205

**"ALTERACIONES INMUNOLOGICAS EN ENDOMETRIOSIS:
AUSENCIA DE ANTICUERPOS ANTIENDOMETRIALES
EN LIQUIDO PERITONEAL."**

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:
DRA. MARIA EUGENIA GONZALEZ MORALES

Asesor: Dr. Felipe Vadillo Ortega



INPer

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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.

DEDICATORIAS.-

A MIS PADRES: Rafael Gonzalez Casas y Ma. Mercedes Morales Juarez.

Por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

A MIS HERMANOS: Rafael, Roberto Carlos, y Gabriela

Por compartir la mayor parte de sus vidas conmigo y por sus detalles através de la vida.

A MI ESPOSO: ISMAEL

Por su amor, apoyo y compañía de hoy y siempre.

Agradezco de manera especial al Dr Felipe Vadillo Ortega, al Químico César Hernández y a todo su equipo de personal en el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Perinatología, que hicieron posible la realización de esta tesis.

A mis maestros :

- Dr. Alberto Kably Ambly.**
- Dr. Carlos Salazar López-Ortiz.**
- Dr. Javier Santos González.**
- Dr. Adalberto Parra.**
- Dr. Hector Hugo Hustos.**
- Dr. Jesus Barrón Vallejo.**
- Dr. Fernando Gaviño.**

A las pacientes del Instituto Nacional de Perinatología por haberme permitido aprender de ellas y con ellas.

TABLA DE CONTENIDOS -

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
JUSTIFICACION	2
ANTECEDENTES	3
FACTORES INMUNOLOGICOS HUMORALES	3
MECANISMOS INMUNOLOGICOS GENERALES	3
FACTORES INMUNES EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS	5
EL SISTEMA INMUNE EN LA ENDOMETRIOSIS: ¿DETERIORA LA FERTILIDAD?	8
ANTICUERPOS ANTIENDOMETRIALES	9
MATERIAL Y METODOS	15
UNIVERSO Y MUESTRA	15
CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION DE LOS PARTICIPANTES	
INSTRUMENTOS Y CONTROLES DE CALIDAD	17
1.-OBTENCION DE ANTIGENOS ENDOMETRIALES	17
2.-CUANTIFICACION DE PROTEINAS	17
3.-SEPARACION DE PROTEINAS ENDOMETRIALES	18
4.-IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS	19
RESULTADOS	20
DISCUSION	26
BIBLIOGRAFIA	28

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La endometriosis es una enfermedad caracterizada por dolor pélvico, dismenorrea e infertilidad. Actualmente la endometriosis solo puede ser diagnosticada por medio de procedimientos invasivos como laparoscopia. El diagnóstico definitivo se hace por visualización y biopsia del tejido sin embargo, el adecuado diagnóstico se ve afectado por múltiples factores por lo que es imperativo utilizar algún método diagnóstico no invasivo, más práctico, no riesgoso y económico.

La hipótesis de que la inmunidad se encuentra alterada en la endometriosis se encuentra propuesta por diferentes autores en diversos estudios proponiendo que la inmunidad humoral como la celular se encuentran alteradas y son incapaces de reaccionar al endometrio ectópico e incluso favorecen su desarrollo.

Aun existe controversia tanto en la existencia de verdadera afectación del sistema inmune, como en los mecanismos que operan en la fisiopatogenia de la enfermedad, Factores inmunológicos pueden causar esterilidad en mujeres con endometriosis por medio de sensibilización a los antígenos endometriales, como parte de una respuesta a inflamatoria a la menstruación retrógrada y ciclica de los implantes endometriósicos intraperitoneales. Esto puede resultar en producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos endometriales. Estos anticuerpos pueden interactuar con endometrio normal o eutópico e interferir con la implantación temprana del embrión.

A pesar de que diferentes estudios ya han sido realizados con este enfoque, aun falta agregar más evidencia experimental que permita integrar el mecanismo de daño.

JUSTIFICACION -

Las razones principales para investigar en esta area se basan en la necesidad de entender mejor los mecanismos inmunológicos que participan en la endometriosis. En esta fase inicial se pretende identificar la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes del endometrio humano presentes tanto en el microambiente peritoneal como en la circulación sanguínea periférica de mujeres con diagnóstico de endometriosis y clasificadas de acuerdo al estado clínico definido por laparoscopia en base a la clasificación de la American Fertility Society.

Una razón más de este estudio es el de orientarse hacia la propuesta de valorar un método diagnóstico para endometriosis alterno a los existentes. Y que si bien ya hay estudios publicados al respecto, la validación de la metodología diagnóstica aun se encuentra en controversia así como la identificación de alguna proteína endometrial antigénica específica para la determinación del padecimiento con precisión y obviamente a bajo costo y riesgo para la paciente.

ANTECEDENTES.-

FACTORES INMUNOLOGICOS HUMORALES EN LA ENDOMETRIOSIS.-

La endometriosis es una enfermedad multifactorial. Ya Sampson en su teoría de la menstruación retrógrada desde 1940 sugiere efectos mecánicos y anatómicos (1), y el efecto preventivo y de disminución originado por el embarazo no fué sorprendente en base a los fundamentos previos.

Parece ser, que la menstruación retrograda ocurre por lo menos en un 90% de las mujeres (2), lo cual es mucho mas frecuente que la endometriosis. Surge la interrogante ahora de cuales son las circunstancias que pueden favorecer el desarrollo de la endometriosis. A través de los años la literatura revela la presencia de explosión de publicaciones sobre la respuesta del huésped al endometrio ectópico; basta mencionar que en una revisión de 1976 a 1982 se registran 7 publicaciones con respecto a inmunidad y endometriosis, comparado con 34 en el periodo de 1983 a 1987, y 57 de 1988 a septiembre de 1992. La búsqueda de componentes de la respuesta del huésped a la enfermedad comprende todos los aspectos de la inmunidad: innata y adquirida, celular y humoral. Además de todo el arsenal para respuesta del huésped, los factores como tiempo (época en la vida reproductiva, fase del ciclo menstrual) y espacio, (en el utero versus cavidad peiritoneal, el utero como sitio de predilección) necesitan ser considerados.

MECANISMOS INMUNOLOGICOS GENERALES.-

La función protectora del sistema inmune (Latín "immunis" derivado de liberación) defensa contra agentes nocivos endógenos y exógenos, lo cual incluye invasores

intracelulares y extracelulares como virus, bacterias, hongos y protozoarios o parásitos, así como sus productos como son las toxinas bacterianas. De igual manera estamos protegidos por la vigilancia inmunológica, esto es, el reconocimiento y eliminación de células aberrantes, para prevenir neoplasias.

Los eventos que rodean la respuesta inmune son excesivamente complejos. La respuesta inicial se lleva a cabo por el sistema inmune innato, proporcionando defensas mas o menos específicas que no requieren exposición previa a los antígenos; en el sentido mas amplio, incluye barreras anatómicas, flora bacteriana fisiológica y secreciones mucosas, como la lisosima. Otras contribuciones son los componentes plasmáticos como el complemento, una familia de proteínas que conduce a una cascada de reacciones resultante en fagocitosis y citólisis bacteriana. También se encuentran involucrados la proteína C reactiva y el interferón que interactúa con las células asesinas naturales (NK) y células de limpieza como los fagocitos polimorfonucleares y macrófagos para la eliminación de agentes indeseables propios y no propios. La inflamación y la destrucción tisular que suceden este proceso resulta en la liberación de gran número de mediadores quimiotácticos solubles y citocinas, estableciendo el escenario para la inducción de inmunidad específica. Las células involucradas son los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos, los linfocitos B y linfocitos T. Las células B producen gran variedad de anticuerpos con diferente estructura, distribución tisular y actividad biológica. Cada célula y su progenie secretan una sola especie de anticuerpos cuya especificidad por unión no cambia. Los anticuerpos cumplen con diversas funciones, p. ej. uniéndose a sus blancos antigénicos (epítopes), pueden originar aglutinación de invasores extraños, neutralización de toxinas y bloqueo de sitios con actividad biológica en moléculas blanco. Los anticuerpos también favorecen la fagocitosis de células procariones y eucariotes en forma independiente o en conjunto con el complemento (opsonización) Finalmente son necesarios para la citotoxicidad mediadas por células anticuerpo-dependientes (ADCC) en conjunto con las células killer NK y citotóxicas.

Las células T tienen funciones como efectoras y reguladoras. Eliminan células blancas específicas por medio de un mecanismo citolítico (T_c, célula T citotóxica). También suprimen (T_s, célula T supresora) y promueve (T_h, célula T cooperadora) respuestas inmunes a través de interacciones con linfocitos y células accesorias. Las células T se encuentran involucradas en la inmunidad antiviral, así como en la reacción huésped contra injerto con su consecuencia, el rechazo al injerto.

La característica de la respuesta inmune específica o adquirida es el fenómeno de memoria, el cual con frecuencia perdura toda la vida. Una vez que los linfocitos han sido sensibilizados por la exposición a un antígeno, un nuevo encuentro resulta en una respuesta mucho más rápida y de mayor amplitud y especificidad, frecuentemente previniendo la enfermedad clínica. Lo anterior fundamenta las bases de la vacunación.

FACTORES INMUNES EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS.-

La endometriosis no es un fenómeno único de la especie humana. Puede ser inducida experimentalmente en gran número de modelos animales (3), aunque el deterioro de la capacidad reproductiva no es universal. En el conejo por ejemplo, la reproducción no parece estar comprometida (4,5) Los primates proveen una mejor comparación para la situación en humanos, al grado de haberse descrito casos espontáneos en monos (6). En humanos, la incidencia de menstruación retrógrada ha sido estimada en un 90% o más (2; 7) pero solo del 1% al 7% de la población femenina se piensa que sufre de endometriosis (8). Además de los factores mecánicos, los eventos inmunológicos pueden contribuir al desarrollo de la endometriosis. La tendencia hacia cierto patrón de disfunción inmunológica puede discernirse de la literatura: parece haber respuesta inmune humoral incrementada así como activación de macrófagos, y disminución de la reactividad de las células T. Este patrón aunque no es universal (9), fue descrito por primera vez por Startseva (10), quien reportó reactividad

incrementada de las células B y disminución de la respuesta de las células T en mujeres con adenomiosis y endometriosis. Diversos autores también han descrito cambios en las poblaciones de leucocitos peritoneales en pacientes con endometriosis y pacientes con esterilidad (11). Dniowski y cols (12) notaron alteración de la función de la célula T. Parece existir supresión citotóxica del estroma endometrial mediada por linfocitos (13).

Mathur y cols (14) notaron concentración elevada de autoanticuerpos (IgG, IgA) contra tejido ovárico y endometrio, incluyendo granulosa y células de la teca, en el suero de las pacientes con endometriosis, pero no en las controles normales. Saifuddin y cols definieron la presencia de autoanticuerpos hacia el epitelio endometrial, en el estroma de mujeres con endometriosis (15).

Existen múltiples estudios de autoanticuerpos en endometriosis (16, 17,18), en donde por lo menos un estudio no pudo demostrar la presencia de anticuerpos antiendometriales (19). En investigaciones subsecuentes de esta controversia, Wild y cols, (1992) señalaron ciertas herramientas metodológicas que pueden afectar la capacidad de estos anticuerpos utilizando inmunofluorescencia indirecta. La presencia de anticuerpos antiendometriales en endometriosis parece estar adecuadamente establecida, y de hecho su asociación se ha propuesta como método diagnóstico junto con otro marcador , Ca-125 (20-21)

Gleicher y su grupo investigaron a pacientes con endometriosis para la búsqueda de 16 autoanticuerpos, y percibieron que sus datos apoyaban el concepto de activación policlonal, una "característica clásica de la enfermedad autoinmune" y comprendieron que la endometriosis podía ser una enfermedad autoinmune. En este contexto tampoco es despreciable que tanto el danazol como los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) son efectivos en el tratamiento de la endometriosis, aunque un estudio encontró que solo el danazol tiene capacidad de suprimir las concentraciones de autoanticuerpos (22) y existen indicios de que el danazol tiene propiedades inmunosupresoras semejantes a las de los corticoesteroides. Por otro lado, Kennedy y cols

encontraron que tanto el danazol como la nafarelina fueron efectivos en suprimir autoanticuerpos antiendometriales y la enfermedad activa (23).

Existen aun interrogantes sin contestar. ¿Es coincidencia la presencia de estos anticuerpos con un síndrome autoinmune generalizado?. ¿Facilitan el escape de endometrio ectópico por medio de destrucción mediada por células-T, quizás bloqueando sitios antigénicos requeridos para reconocimiento de las células T citotóxicas o T cooperadoras?. O son consecuencia de una respuesta inmune degenerada en donde el endometrio ectópico en lugar de degenerar sin reconocimiento inmune, es procesado por macrófagos y otras células presentadoras de antígenos en una respuesta inmune generalizada que conduce a producción de anticuerpos ?. Halmé y colaboradores demostraron que existen cambios cíclicos en la actividad macrofágica en los ciclos menstruales de mujeres normales y de aquellas con endometriosis. La producción de factores de crecimiento por macrófagos se encuentra más acentuada en la endometriosis, un factor potencial para la mantención de endometrio ectópico. Algunos de estos factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), pueden promover la proliferación de estroma endometrial in vitro demostraron que el danazol y la buserelina suprimen la densidad de receptores para factores de crecimiento (EGF), estrogénicos y de progesterona en endometrio ectópico y eutópico.

La actividad NK también se encuentra alterada en la endometriosis. La actividad de NK en sangre periférica y líquido peritoneal en ensayos ya estandarizados (células K562) y en contra de células endometriales homólogas se encuentra disminuida en la endometriosis. Badaway y cols (1987) demostró no solo un incremento en células T y B en líquido peritoneal, sino que también preponderancia de células T cooperadoras, que apoyan la noción de disfunción reguladora en respuesta a, o como causa de , endometrio intraperitoneal. Una citocina que indudablemente contribuye significativamente en la patología de la endometriosis es la Interleucina -6 (IL-6). Esta es una citocina multifuncional, que involucra una gran variedad de procesos neoplásicos (24). La

interleucina IL-6 está presente en altas concentraciones en pacientes con adherencias pélvicas no atribuibles a endometriosis.

EL SISTEMA INMUNE EN ENDOMETRIOSIS: ¿DETERIORA LA FERTILIDAD?

Parece ser que la capacidad reproductiva se encuentra alterada aun en casos de endometriosis mínima, cuando no existe compromiso mecánico aparente. La causa de esto puede ser múltiple: una disfunción ovulatoria oculta, condicionada por un ambiente hormonal hiperprolactinémico en ocasiones observado con la consecuente disminución de gonadotropinas en sangre, un tamaño folicular más pequeño, niveles hormonales más bajos de estradiol, hormona luteinizante o de progesterona, fase lutea inadecuada. La activación de macrófagos se acompaña de incremento en la fagocitosis de espermia, aunque los anticuerpos antispermia no necesariamente se incrementan, y el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis no parecen dañar la motilidad espermática in vitro líquido peritoneal de pacientes con endometriosis disminuye la capacidad de unión espermática a la zona pelúcida in vitro (25). La liberación de proteasas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y otros productos macrofágicos mediadores de la respuesta inflamatoria como prostaglandinas o fibronectina (26), además de su papel probable como promotores de la formación de adherencias peritoneales y esterilidad de causa mecánica, puede existir toxicidad hacia los gametos de cualquier sexo o que afectan adversamente el medio en que interaccionan.

Fakih y cols (1987) y Uda e Umesaki (1991) han demostrado la asociación entre endometriosis y la producción de IL-1, y un mediador inflamatorio producida por los macrófagos. Se ha descubierto que la IL-1 interfiere la interacción ovulo espermatozoide y es tóxica a embriones in vitro (Sueldo y cols, 1990, Taketani y cols, 1992) Taketani y cols. encontraron que los niveles de IL-1 y TNF se encontraban elevados en pacientes con endometriosis, y muy bajos en pacientes con endometriosis posterior al tratamiento con

danazol o buserelina. La influencia exacta de IL-1 sobre endometrio eutópico y ectópico es incierta, se ha demostrado que la IL-1 inhibe el crecimiento de células de estroma endometrial in vitro. Halme especifica que el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), que se encuentra normalmente presente en el epitelio glandular del endometrio, se encuentra ausente en el tejido endometrial ectópico.

El complemento, un sistema de enzimas citolíticas y quimiotáxicas que interactúa con linfocitos y células presentadoras de antígenos, también se encuentra incrementado en endometriosis, y sus niveles parecen correlacionarse inversamente con la oportunidad de lograr embarazo. Estudios realizados por Isaacson y colaboradores sugieren que el endometrio ectópico por sí solo puede ser fuente de por lo menos un componente del complemento, C3. También es sabido que el complemento es quimiotáctico para los linfocitos y macrófagos y que puede contribuir al ambiente hostil que daña en la endometriosis.

ANTICUERPOS ANTIENDOMETRIALES.-

Weed y Arquembourg (1980) emitieron como hipótesis que el endometrio ectópico puede actuar como gatillo para inducir una respuesta inmune que resulte en esterilidad. Basaron esta hipótesis en el hallazgo de depósito del componente C3 del complemento sobre las células de recubrimiento epitelial de las glándulas endometriales de pacientes con endometriosis. Además, los componentes del complemento C3 y C4 fueron encontrados en valores más elevados en suero y líquido peritoneal de pacientes con endometriosis que en los controles (Badaway y cols, 1984). Lo anterior no pudo ser confirmado por otros autores. Numerosos reportes se concentraron en el papel del sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad, sobre la esterilidad observada en pacientes con endometriosis y en los

métodos no invasivos de la enfermedad. Las principales áreas de interés fueron la demostración de inmunoglobulinas y factores del complemento en endometrio y en los implantes endometriósicos, los niveles de factores inmunológicos no específicos en suero y líquido peritoneal, y la demostración de anticuerpos específicos antiendometriales en suero y líquido peritoneal para ser utilizados como marcadores de la enfermedad.

ANTICUERPOS ANTIENDOMETRIALES SERICOS.-

Para evaluar la utilidad de los anticuerpos antiendometriales en suero como herramientas de diagnóstico para endometriosis, necesitamos conocer la sensibilidad y especificidad de la prueba. La posibilidad de valores predictivos positivos y negativos nos permitirá estimar el valor de la prueba para estudiar al paciente en forma individual, y comparar las pruebas en este aspecto.

Mathur y cols, (1982), utilizando una prueba de hemaglutinación pasiva, en extractos antigénicos de endometrio de mujeres con ciclos menstruales normales, encontraron un título positivo de anticuerpos (media de el control +2SD) en la mayoría de los pacientes con endometriosis. La prueba tiene una sensibilidad de 84% y una especificidad de 100%. Wild y Shivers (1985) compararon 35 mujeres estériles con endometriosis con 8 mujeres estériles sin la enfermedad(ensayo de inmunofluorescencia indirecta en tejido endometrial congelado de controles sin la enfermedad) y encontraron una sensibilidad de 71% y una especificidad de 50%. Extendiendo el grupo control para incluir pacientes estériles y no estériles, la sensibilidad se transformó en 71% y la especificidad en 87%. Chihai y colaboradores (1986), utilizando hemaglutinación pasiva contra extractos antigénicos de tejido endometrial normal en pacientes con endometriosis y controles fértiles sin la enfermedad, encontró sensibilidad de 74% y especificidad de 100%. Meck y cols (1988) utilizó inmunodifusión de Ouchterlony y comparó 20 pacientes con endometriosis y 20 pacientes control sin la enfermedad.

Encontraron sensibilidad del 75% y especificidad de 90% Wild y cols (1991) reportaron con el uso de inmunofluorescencia indirecta, una manera semicuantitativa de investigar el contenido de anticuerpos antiendometrio, en un gran grupo de pacientes: 72 casos y 21 controles. Encontrando una sensibilidad de 85% y especificidad de 67% Los antígenos utilizados en esta prueba fueron epitelio monoestratificado de la línea del carcinoma endometrial. La tabla 1 muestra los resultados de estudios realizados en suero con búsqueda de anticuerpos antiendometriales.

TABLA 1. Confiabilidad de los anticuerpos antiendometriales para el diagnóstico de endometriosis.

Referencia	Sensibilidad	Especificidad	valor predictivo	
			Positiva	Negativa
Chihal (1986)	0.74	1.00	---	0.26
Meek (1988)	0.75	0.90	7.50	0.28
Wild (1991)	0.83	0.79	3.95	0.22
Wild (1991b)	0.85	0.67	2.6	0.22

Aunque la sensibilidad epidemiológica de los estudios de anticuerpos antiendometriales en suero como herramientas para endometriosis sobrepasa a la determinación de CA-125, no satisface el criterio para considerarse como método de selección. La naturaleza de los radios indica que la mayor aplicación clínica de estas pruebas en un futuro puede ser el estimar la naturaleza de la enfermedad en el paciente en forma individual, especialmente en los centros de referencia terciaria. Debe tomarse en cuenta de cualquier manera, que las técnicas utilizadas son de naturaleza subjetiva, semicuantitativa o solo cualitativa. A pesar de ello la determinación de anticuerpos endometriales ha sido propuesta no solo como marcador de la

enfermedad en procedimientos de screening, y como marcadores de resultado de tratamientos y recurrencia.

ANTICUERPOS ANTIENDOMETRIALES DEL LIQUIDO PERITONEAL.-

Halme y Mathur (1987) utilizaron un ensayo de aglutinación pasiva para documentar los anticuerpos antiendometriales en el líquido peritoneal de 22 pacientes y 22 controles. Encontrando una sensibilidad de 23% y una especificidad de 96%. MeeK y cols (1988) utilizando inmunodifusión de Ouchterlony encontraron una sensibilidad de 75% y una especificidad de 90%.

De los estudios comentados con anterioridad parece ser que los anticuerpos antiendometriales son más comunes en el suero de mujeres con endometriosis que en los sueros control. No hubo relación entre los títulos de anticuerpos y la severidad de la enfermedad. La naturaleza autoinmune de este padecimiento es apoyada por la deficiencia de la inmunidad mediada por células comprobada en estas pacientes (Dimovsky y cols, 1981; Oosterlynck y cols 1991; Viganò y cols, 1991) y la activación policlonal de las células B sugerida por Gleicher y cols (1987).

Aún quedan problemas que resolver, antes que un ensayo para anticuerpos antiendometriales pueda ser desarrollado. En primer lugar, el antígeno contra el cual los anticuerpos específicos antiendometriales está dirigido no se conoce, aunque el lugar exacto en las glándulas ha sido determinado por inmunohistoquímica (Kennedy y cols, 1990h). Un estudio anterior de Saifuddin y cols (1983) utilizando inmunofluorescencia en endometrio fijado ha demostrado un incremento en la tinción epitelial para IgG en pacientes con endometriosis, sugiriendo que la mujer con endometriosis desarrolla anticuerpos contra un antígeno del epitelio endometrial. Wild y cols (1987) demostraron por inmunofluorescencia directa en preparaciones aisladas glandulares que la unión del anticuerpo ocurre principalmente en el

citoplasma de las glándulas endometriales. Mathur y cols (1988) utilizaron análisis con Western blot para estudiar los patrones de peso molecular de los antígenos endometriales. Concluyeron que la autoinmunidad endometrial humoral y local es dirigida hacia antígenos con pesos moleculares entre 26000 y 34000. En el último estudio los antígenos endometriales se obtuvieron del endometrio de dos mujeres fértiles sometidas a histerectomía. Garza y cols (1991) demostraron diferencias antigénicas entre el endometrio de pacientes con y sin endometriosis. Lo anterior tiene consecuencias para el desarrollo de un ensayo de anticuerpos endometriales. El segundo problema es que los autoanticuerpos no pueden producirse en un modelo animal. Tercero, la inmunidad no puede ser producida en un modelo animal por el antígeno. De ahí que las tres condiciones mayores para establecer a la endometriosis como una enfermedad autoinmune no se encuentran establecidos. Además los anticuerpos antiendometriosis disminuyen con la severidad de la enfermedad.

Otro problema mayor es la antigenicidad del endometrio. En otras palabras, ¿por qué los anticuerpos contra un antígeno propio las glándulas endometriales se desarrollan? Se sugieren las siguientes posibilidades.

- 1) La menstruación retrógrada predispone a una enfermedad autoinmune en mujeres susceptibles genéticamente. Una predisposición genética supuestamente conduce a una reactividad anormal contra antígenos propios. Estudios en diferencias de HLA entre pacientes con y sin endometriosis no fueron suficientes para sostener dicha diferencia.
- 2) Una disminución en la actividad de las células T supresoras en mujeres con endometriosis comparadas con mujeres sin la enfermedad que se ha sugerido conduce a un aumento en la respuesta de anticuerpos antiendometriales.
- 3) Los antígenos de las pacientes con endometriosis son diferentes a los de las pacientes sin la enfermedad.

- 4) El endometrio fuera de la cavidad uterina es un antígeno mas potente que el endometrio dentro del utero .

- 5) Los anticuerpos desarrollan una reacción cruzada en el endometrio de antígenos presentes en infecciones por virus o bacterias durante una infección activa temprana .

MATERIAL Y METODOS.-

UNIVERSO Y MUESTRA.-

Pacientes pertenecientes a la clinica de esterilidad del INPer detectadas durante el periodo comprendido entre 01 de Noviembre de 1994 al 01 de Noviembre de 1995 sometidas a laparoscopia diagnóstica como protocolo de estudio y en las que se realizó diagnóstico de endometriosis.

Pacientes provenientes de la misma clinica de esterilidad en las que se realizó laparoscopia diagnóstica y en las que no se defina una causa específica de esterilidad.

CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION DE LOS PARTICIPANTES.-

CRITERIOS DE INCLUSION.-

GRUPO 1. MUJERES CON ESTERILIDAD Y ENDOMETRIOSIS.

1. Pacientes con diagnóstico de esterilidad en estudio, con edad entre 25 y 35 años, con indicación de laparoscopia diagnóstica y en las que se establezca el diagnóstico de endometriosis de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1.1) Clasificada de acuerdo al criterio laparoscópico de la American Fertility Society.
- 1.2) Valorada y clasificada en estadio clínico laparoscópico mediante videolaparoscopia confirmada por al menos tres diferentes medicos especialistas.
- 1.3) Endometriosis confirmada por biopsia de lesiones y estudio histopatológico.

1.4) Aquellas en las que la toma de líquido peritoneal libre en cavidad y muestra de sangre periférica fué posible.

GRUPO 2. MUJERES CON ESTERILIDAD SIN ENDOMETRIOSIS.

1.- Pacientes con diagnóstico de esterilidad en estudio con edades entre 25 y 35 años .

2.- En las que se realice laparoscopia diagnóstica.

CRITERIOS DE EXCLUSION.-

1. Pacientes con diagnóstico previo de endometriosis la cual halla sido tratada medicamente o quirurgicamente.

2. Paciente con diagnóstico de enfermedad inflamatoria pélvica durante la laparoscopia diagnóstica para estudio de su esterilidad.

UNIDADES DE OBSERVACION.-

El grupo experimental comprendió los líquidos peritoneales y sangre periférica de todas las pacientes. Investigando la presencia de anticuerpos antiendometriales específicos y tentativamente comparar la presencia o la ausencia de los mismos.

La observación de patrones de bandas entre diferentes muestras se comparó para resaltar las diferencias entre los 4 grupos de pacientes que proporcionaron los biológicos.

INSTRUMENTOS Y CONTROLES DE CALIDAD.-

MUESTRAS BIOLÓGICAS.- Se colectaron entre 5 y 10 ml de líquido peritoneal durante las laparoscopias de cada uno de los grupos definidos. Simultáneamente se toman 5 ml de sangre venosa con anticoagulante y se separó el plasma. Las muestras fueron alícuotadas y almacenadas a -20° C hasta su análisis.

1.- OBTENCION DE ANTIGENOS ENDOMETRIALES.-

Se utilizaron como fuente de antígenos extractos de biopsias de endometrio, utilizando remanentes de biopsias de endometrio realizadas a pacientes en estudio de esterilidad y en las que no se encuentre alteración local.

Una vez obtenido, el tejido es lavado exhaustivamente con solución salina isotónica para eliminar la sangre.

Las biopsias obtenidas se homogenizan mecánicamente empleando un disgregador (Politron Ins.) en solución amortiguadora de Tris 0.05M, Na Cl 0.15M, Tritón X-100 0.1% pH 7.4.

La suspensión obtenida se centrifuga a 10,000 r.p.m durante 10 minutos.

Se descarta el precipitado y se utiliza la fase soluble.

2.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS .-

Se determinó la concentración de proteínas presentes en la fase soluble mediante la técnica de Bradford, la cual emplea como reactivo color azul de coomasie al 0.01% usando como recta de calibración albúmina bovina sérica.

3.- SEPARACION DE PROTEINAS ENDOMETRIALES POR ELECTROFORESIS VERTICAL EN GELES DISCONTINUOS DE ACRILAMIDA.-

Se realizó una mezcla de 5 extracciones de proteínas del endometrio para utilizarse como antígeno en la búsqueda de autoanticuerpos dirigidos especialmente a células del epitelio endometrial.

Así mismo se realizó la separación electroforética de las diversas concentraciones de proteínas endometriales para definir la cantidad óptima a emplear, tomando como criterio la identificación del máximo número de bandas proteicas mediante tinción del gel con solución de azul de Coomassie. Y la determinación de los pesos moleculares de las bandas proteicas endometriales, se llevó a cabo mediante comparación con marcadores de peso molecular:

MARCADOR	PESO MOLECULAR (PM) (Kilo Daltones)
1.- Lisozima	15,400 KD
2.- Beta-lactoglobulina	18,300 KD
3.- Anhidrógeno Carbónico	24,000 KD
4.- Ovoalbumina	45,500 KD
5.- Albumina bovina	74,250 KD
6.- Fosforilasa B	97,400 KD
7.- Miosina	214,200 KD

IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA ENDOMETRIO PRESENTES EN LIQUIDO PERITONEAL Y SANGRE PERIFERICA.

Se utilizaron muestras provenientes de 5 mujeres con infertilidad idiopática, 10 con endometriosis y 5 normales. La identificación de los autoanticuerpos se realizó por medio de la técnica de Western-Blot.

Se utilizó la concentración de 30.0 microgramos por pozo para correr las proteínas de cualquiera de los extractos de poliacrilamida con SDS (PAGE). Utilizando el sistema discontinuo propuesto por Laemmli en condiciones reductoras. (10).

Las proteínas separadas en Page fueron transferidas electroforéticamente a membranas Immobilon - P (Millipore, Bedford, Ma).

Con objeto de revelar la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes de endometrio, se utilizó un sistema ternario de captura de anticuerpo en fase sólida. El sistema de anticuerpo primario en este sistema está contenido en el líquido peritoneal y plasma de las pacientes y que reconocerá alguno de los componentes de los extractos de endometrio separados por electroforesis. La detección de estos anticuerpos se realizó utilizando anticuerpos polivalentes biotinilados dirigidos contra IgG (Sigma Chemical Co.).

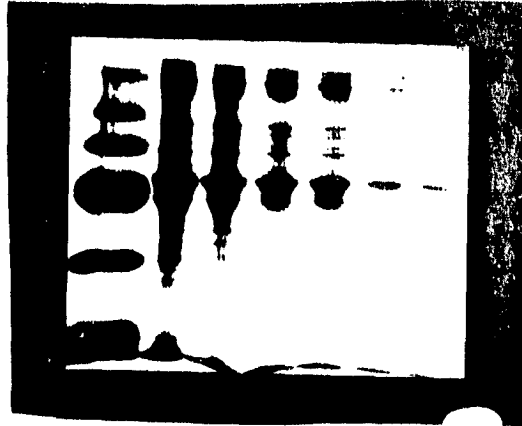
Estos segundos anticuerpos a su vez fueron reconocidos por complejos avidina-peroxidasa que reacciona a diaminobenzidina generando color.

Tanto la intensidad como la posición relativa de las bandas reconocidas por los anticuerpos se comparan entre grupos utilizando un sistema de análisis de imágenes por densitometría (Fotodyne, WI).

RESULTADOS.-

Identificamos por medio de electroforesis en gel de acrilamida al 4.5 y 10%, las proteínas separadas por carga eléctrica y peso molecular, encontrando seis valores (carriles 2 al 7), comparando con marcadores de peso molecular conocidos (carril 1)

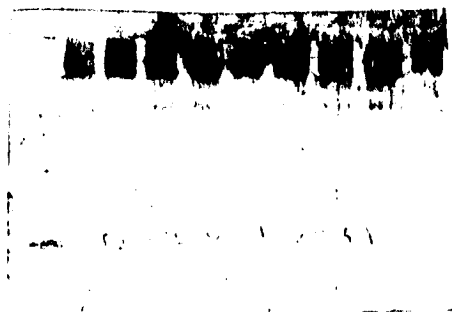
Fig. 1



Para la interpretación de los resultados debemos observar la presencia de bandas con un patrón de color revelado al interaccionar el complejo avidina peroxidasa con el autoanticuerpo polivalente biotinilado contra IgG, lo cual significa la presencia de una banda color café sobre la membrana donde los autoanticuerpos están uniendo a la proteína endometrial que reconocen como antígeno, formando el complejo de los tres anticuerpos.

Si por algún motivo falta alguno de los tres anticuerpos que interaccionan, no es posible que aparezca la banda excepto que esté apareciendo reacción cruzada o inespecífica.

Fig. 2.



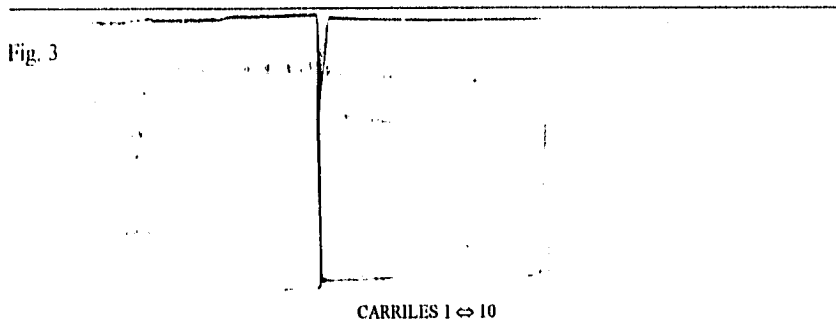
CARRILES 1 ↔ 10

Carril.

- 1 ↔ Marcadores de peso molecular
- 2 a 4 ↔ Normales
- 5 a 7 ↔ Esterilidad sin endometriosis
- 8,9,10 ↔ Endometriosis (8=I, 9=II, 10=III)

Observando las columnas que se presentan en el análisis de Western Blot de plasma de sangre periférica, a una dilución 1:100, como primer anticuerpo contra los marcadores de peso molecular, podemos observar los resultados tomando en cuenta las columnas como se enuncian.

Fig. 3



CARRILES 1 ⇔ 10

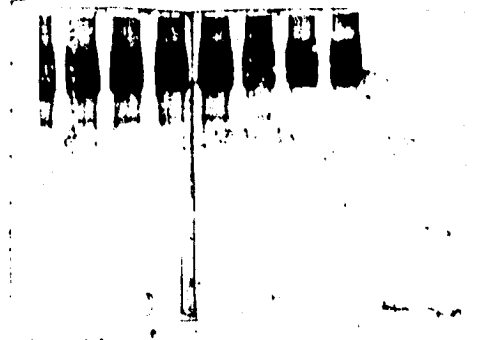
Carril.

- 1 ⇔ Marcadores de peso molecular
- 2 a 4 ⇔ Normales
- 5 a 7 ⇔ Esterilidad sin endometriosis
- 8,9,10 ⇔ Endometriosis (8=I, 9=II, 10=III)

Del mismo modo se observa la distribución observada de coloración en el análisis del líquido peritoneal (LP) como primer anticuerpo a una dilución de 1:20 con la misma distribución y orden del origen de las muestras.

Las figuras anteriormente descritas demuestran un patrón de distribución de bandas en ambas membranas (SP y LP), el cual es el mismo sugiriendo que la presencia de autoanticuerpos fueran contra las mismas moléculas proteicas endometriales, tanto en líquido peritoneal como en sangre periférica, y a su vez en los tres grupos de pacientes. Lo anterior llama grandemente la atención por lo que se decide investigar si es que se trata de un artefacto metodológico o bien se corrobora el hallazgo.

Fig. 4.



CARRILES 1 ↔ 10

Carril.

- 1 a 8 ↔ Con segundo anticuerpo.
 9 ↔ Sin segundo anticuerpo.
 10 ↔ Con segundo y sin tercer anticuerpo Biotinilado.

En esta imagen se corren el experimento según ya ha sido descrito, sin adicionar el líquido peritoneal o la sangre periférica, que corresponden al primer anticuerpo en ambos casos sólo se adiciona el segundo anticuerpo de los columnas 1 a la 8, en la novena no se adiciona este último, y en el 10 se adiciona el 2o, pero no el 3er anticuerpo biotinilado. Los carriles 1 a 8 corresponden a :

COLUMNA	MUESTRA CORRESPONDIENTE
1 y 2 ↔	Estracto de endometrio 1
3 y 4 ↔	Estracto de endometrio 2
5 y 6 ↔	Estracto de endometrio 3
7 y 8 ↔	Estracto de endometrio 4

El experimento anterior determina que es el segundo anticuerpo (anti IgG humana) el que manifiesta una reacción cruzada es decir que se encuentra reconociendo estructuras

proteicas presentes en el endometrio que tienen cierta similitud o parecido con las estructuras antigénicas de la inmunoglobulina G humana.

Como posibilidad vale la pena mencionar que es probable la contaminación de tejido endometrial con sangre periférica que contiene inmunoglobulinas durante su extracción, pero ya que se realiza un lavado exhaustivo así como una disección cuidadosa de las muestras esta posibilidad queda descartada.

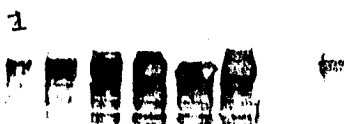


Fig. 5.

Columna 1 \Leftrightarrow 1 mg/pozo

Columna 2 \Leftrightarrow 5 mg/pozo

Columna 3 \Leftrightarrow 10mg/pozo

Columna 4 \Leftrightarrow 15mg/pozo

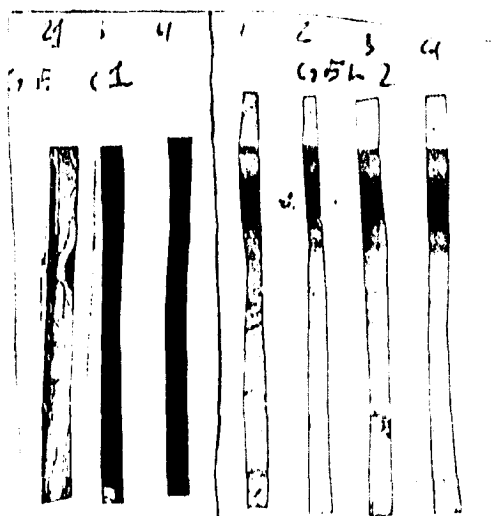
Columna 5 \Leftrightarrow 20 mg/pozo.

Columna 6 \Leftrightarrow 30mg/pozo

Columna 7 \Leftrightarrow 30 mg/pozo (sin 2º anticuerpo)

Con la finalidad de investigar el fenómeno de reacción cruzada entre el segundo anticuerpo y las proteínas endometriales, se realiza otro experimento. El anterior consiste en que se aumenta paulatinamente la concentración de proteínas proveniente del endometrio, aumentando la intensidad de la coloración de la reacción según la cantidad de proteínas. No así en la columna donde no se adicionó el segundo anticuerpo.

Fig. 6.



Finalmente se realiza una ultima reacción utilizando ahora como primer anticuerpo uno del tipo monoclonal contra IgG humana, (carriles 1-3). Un anticuerpo policlonal contra la extracción de proteínas de endometrio No 1 (carriles 4-6); y utilizando el policlonal contra extracto de proteínas No. 2 (carril 7).

Con lo anterior corroboramos que es un artefacto lo que estamos encontrando o bien dependiente del tipo de segundo anticuerpo que utilizemos es posible obtener un patron de bandas determinado.

DISCUSION.-

El papel de la respuesta inmune en la fisiopatología de la enfermedad consiste principalmente en una acción facilitadora dependiente de una actividad citotóxica suprimida mediada por linfocitos, y a la vez facilitadora por la misma deficiencia en dicho sistema con lo cual se observa tolerancia de endometrio ectópico.

En nuestras manos no fue posible observar bandas al utilizar el anticuerpo monoclonal contra IgG humana, haciendo mención de antemano que es un anticuerpo de unión muy selectiva y de poca afinidad. Por lo tanto no fue posible la identificación de anticuerpos antiendometriales. El por que de este hallazgo puede tener diversas explicaciones.

El motivo de no haber podido identificar la presencia de autoanticuerpos puede ser debido a fallas en el método, lo cual es poco probable puesto que la especificidad y sensibilidad del Western Blot son de las más altas conocidas. Y a su vez otros autores con el mismo método han demostrado la presencia de anticuerpos antiendometrio.

En este estudio encontramos reactividad a proteínas endometriales, de hecho idénticas a las reportadas en la literatura. Sin embargo estas bandas son reconocidas de modo inespecífico, por lo tanto no son proteínas endometriales reconocidas por autoanticuerpos.

Otra posibilidad en cuanto a los hallazgos es que durante el proceso de extracción de las proteínas endometriales los antígenos de estas se desnaturalicen y las epítopes antigénicas se modifiquen o no sea posible identificarlas. Las bandas que se obtienen en nuestro sistema en ausencia del primer anticuerpo (LP o SP) se deben a una reacción cruzada y se descarta la posibilidad de que sea debido a contaminación por inmunoglobulinas provenientes de sangre periférica.

El experimento de validación realizado en este estudio para corroborar reacciones cruzadas no fue utilizado por otros autores que encuentran positividad en la identificación de anticuerpos por lo cual creemos que sus resultados no son válidos.

Valdría la pena seguir corroborando nuestro experimento con el uso de diferentes anticuerpos monoclonales con mayor especificidad para ver si es posible identificar con exactitud las inmunoglobulinas y así poder establecer el peso molecular y en un futuro la estructura celular contra la cual se dirigen los anticuerpos encontrados.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Sampson J, The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *Am J. Gynecol Obstet* 1940, 40:549
- 2.- Blumenkantz MJ, Gallagher N, Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 1981, 57:667.
- 3.- Vernon MW, Experimental endometriosis in laboratory animals as a research model. *Prog Clin Biol Reserch* 1990, 323:49.
- 4.- Dunselman GA, Land JA, Effect of endometriosis on ovulation, ovum pickup, fertilization and tubal transport in the rabbit. *Jour Reprod Med* 1988,82:193.
- 5.- Dunselman GA, Dumoulin JC, Land JA, Lack of effect of peritoneal endometriosis on fertility in the rabbit model. *Fertil Steril*, 1991 56:340.
- 6.- Binhazim AA, Tnra RP, Spontaneous external endometriosis in a De Brazza's monkey. *Journal Copar Pathol*. 1989, 101:471.
- 7.- Hahne J, Becker S, Acentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am Journal Obstet Gynecol*. 1984, 156: 783
- 8.- Barbiery RL Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am Journal Obstet Gynecol*. 1990, 162:566
- 9.- Meeck SC, Hodge DD, Autoimmunity in infertile patients without endometriosis. *Am Journal Obstet Gynecol*, 158: 1355.
- 10.- Heaney AF, Muscato JJ, Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril*. 1981, 35: 696.
- 11.- Damousky WP, Steele RW, Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am Journal Obstet Gynecol*. 1981 141:377.
- 12.- Vigan'o P, Vercellini P, Deficient antiendometrium lymphocyte mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1991,56:894.

- 13.- Mathur S, Peresess MR. Autoimmunitu to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exper Immunol* 1982, 50:259.
- 14.- Saifuddin A, Buckley CH. Immunoglobulin content of the endometrium in women with endometriosis. *Intern Journal Ginecol Pathol* 1983,2:255
- 15.- Badaway SZ, Cuenca V, Autoimmune fenomeno in infertile women with endometriosis. *Obstet Ginecol*, 1984, 63:271.
- 16.- Gleicher N, Damowsky WP. Linfocite subsets in endometriosis. *Obstet Ginecol* 1984, 63:463
- 17.- Steele RW, Damowsky WP, Immunológico aspects of human endometriosis. *Am Journal Obstet Ginecol*, 1984,6:33,
- 18.- Confino E, Harlow L, Peritoneal fluid and serum autoantibody levels in patients with endometriosis, *Fertil Steril* 1990,53:242.
- 19.- Switcheuco AC, Kauffman RS, Are there antiendometrial antibodies in sera of Women with endometriosis?, *Fertil Steril*, 1991 56: 235.
- 20.- Barbieri RL, Niloff JM. Elevated serum concentrations of Ca-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1986,15: 630.
- 21.- Giudice LC, Jacobs A, Pineda J, Serum levels of Ca-125 in patients with endometriosis: A preliminary report, 1986, 45: 876
- 22.- El-Roeiy A, Dmowsky WP. Danazol but not gonadotropin releasing hormone agonist supresses autoantibodies in endometriosis. *Fertil Steril* 1988, 50:284.
- 23.- Kenedy SH, Starkey PM, Antiendometrial antibodies in endometriosis mesured by enzyme by an enzimed linked immunoabsorbent assay bofore and after the ttreatment with danazol and nafarelina, *Obstet Gineco* 1991.75: 914.
- 24.- Buyalos RP, , Watson JM Detection of Interleukin-6 levels in peritoneal fluid of patients of pelvic pathology, *Fertil Sterility*, 1992,58:302.

25.-.Coddington CC, Oehninger S, Peritoneal fluid from patients with endometriosis decreases sperm binding to the zona pellucida in the hemizona assay: a preliminary report. *Fertil, Steril* 1992, 22:783.