



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.

FE DE ERRATAS

<u>PAGINA</u>	<u>PARRAFO</u>	<u>DICE</u>	<u>DEBE DECIR</u>
58	4	proteína	proteína
64	2	antigüos	antiguos
114	título	protéicas	proteicas
167	5	vegetales	vegetales
174	5	catgut 0	catgut crómico
193	tabla 12	31	51
193	tabla 12	80	60
193	tabla 12	124	164
193	tabla 12	280	240
205	tabla 20	LAPAROTOMIAS	VALORES MEI
261	3	como	cómo
266	título de la tabla 55	Interferón alfa 2b	Interferón b
287	2	huida	huída
295	1	fallecimiento	fallecimien

En la página 79, la referencia bibliográfica (267), situada en el centro del último p debe colocarse al final del mismo.

La tabla 23, situada erróneamente en la página 209 antes que las tablas 21 y 22, d colocarse por detrás de dichas tablas (dos páginas más atrás).

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**"EFECTOS DE LOS INTERFERONES ALFA 2B RECOMBINANTE
HUMANO Y BETA HUMANO SOBRE LA ENDOMETRIOSIS
EXPERIMENTALMENTE INDUCIDA EN LA RATA WISTAR".**

JOSE M^a RODRIGUEZ INGELMO



UNIVERSIDAD DE ALICANTE

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA

TESIS DOCTORAL

Efectos de los Interferones alfa 2b recombinante humano y beta humano sobre la endometriosis experimentalmente inducida en la rata Wistar.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por
D. José M^a Rodríguez Ingelmo, médico especialista
en Obstetricia y Ginecología.

Directores: Prof. Dr. D. Francisco Quereda Seguí. Profesor titular de
Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Alicante.

Prof. Dr. D. Pedro Ación Alvarez. Catedrático de Obstetricia y
Ginecología de la Universidad de Alicante.

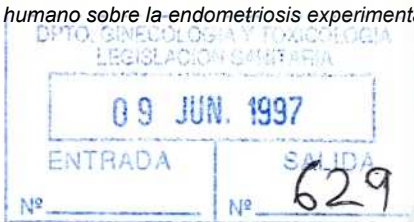
Alicante, Julio de 1997.

Investigación subvencionada parcialmente
por el FISs, ayuda n^o 96/0825

UNIVERSIDAD DE ALICANTE



PROF. PEDRO ACIEN
CATEDRÁTICO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA



3

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA
CAMPUS DE SAN JUAN - AP. CORREOS 374
TFNOS. 96/590 39 37 Y 590 39 34
FAX 96/590 39 87
03080 ALICANTE

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

D. FRANCISCO JOSÉ QUEREDA SEGUÍ,
Doctor en Medicina, Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología
Y
D. PEDRO ACIÉN ÁLVAREZ,
Doctor en Medicina, Catedrático de Obstetricia y Ginecología

DE LA
Facultad de Medicina de la Universidad de Alicante

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado “EFECTOS DE LOS INTERFERONES ALFA 2B RECOMBINANTE HUMANO Y BETA HUMANO SOBRE LA ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTALMENTE INDUCIDA EN LA RATA WISTAR”, ha sido realizado por D. **José María Rodríguez Ingelmo**, bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en esta Universidad de Alicante.

San Juan, a 9 de Junio de 1997

Fdo. Prof. F. Quereda Seguí

Fdo. Prof. P. Acien Alvarez



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A la memoria de T.S. Cullen, de Jaime Brotons y la de todos aquellos que dedicaron mucho esfuerzo al conocimiento de esta enfermedad, y que ya no se encuentran entre nosotros. Ellos están en la mente y en el corazón de quienes los conocieron y quisieron, pero también están en el recuerdo de los que los admiramos.

A mi familia, por su amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. D. Pedro Acién Álvarez y al Profesor Dr. D. Francisco Quereda Seguí, por tutelar mi trabajo de forma liberal, permitiéndome desarrollar mis iniciativas y ayudándome con sus consejos y su experiencia cuando lo necesité. También por sus continuas palabras de ánimo y, sobre todo, por su amistad.

A las Dras. Dña. Concepción Hernández y Dña. Teresa Gómez, con quienes compartí esfuerzos en el laboratorio, por haber hecho de la concordia y la ayuda mutua un principio inviolable desde el comienzo hasta el final de nuestras investigaciones.

A María, mi mujer, por su ayuda en la ardua tarea de procesar los 23.400 datos recogidos y por sus críticas en la redacción del manuscrito.

A Isabel y Carlos, porque, a pesar de su corta edad, supieron comprender lo importante que era el tiempo para mí y me premiaron con su alegría en los momentos de descanso.

Al personal del animalario de la Facultad de Medicina de Alicante, por su dedicación y el exquisito cuidado con el que llevaron a cabo la labor técnica del mantenimiento de las condiciones de estabulación de los animales.

A TODOS, MI GRATITUD.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	11
ENDOMETRIOSIS HUMANA.....	13
Concepto.....	13
Historia.....	15
Epidemiología.....	29
Distribución de la endometriosis.....	29
Edad, raza y estado socio-económico.....	32
Factores familiares y genéticos.....	32
Factores menstruales.....	33
Hormonas endógenas.....	34
Hormonas exógenas.....	35
Factores inmunológicos.....	36
Tóxicos ambientales.....	36
Histopatología.....	37
Localización.....	37
Aspecto macroscópico.....	40
Características microscópicas.....	41
Receptores hormonales.....	42
Malignización.....	43
Fluido peritoneal.....	44
Clínica y fisiopatología.....	45
Síntomas.....	45
<i>Síntomas habituales de la endometriosis pélvica.....</i>	<i>46</i>
<i>Síntomas dependientes de localizaciones específicas.....</i>	<i>52</i>
Hallazgos exploratorios.....	53

Diagnóstico.....	54
Temperatura basal.....	55
Marcadores bioquímicos e inmunológicos.....	56
Pruebas radiológicas de diagnóstico por la imagen.....	60
Sistemas de puntuación combinados.....	61
Laparoscopia.....	62
Clasificación.....	65
Tratamiento.....	74
Conducta expectante.....	75
Tratamiento sintomático.....	75
Tratamiento médico hormonal.....	77
Tratamiento quirúrgico.....	85
Tratamiento combinado médico-quirúrgico.....	86
Técnicas de reproducción asistida.....	87
Fundamentos etiopatogénicos para la elaboración de la hipótesis.....	90
Fisiología del sistema inmune.....	95
Alteración de la inmunidad celular en la endometriosis.....	105
Modificaciones de la inmunidad humoral.....	106
Células citotóxicas espontáneas (NK) y endometriosis.....	109
Macrófagos peritoneales.....	110
Citocinas y endometriosis.....	112
Factores de crecimiento y otras moléculas proteicas.....	114
Integrinas.....	116
Modulación o manipulación inmunológica.....	118
ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL.....	120

Justificación de la endometriosis experimental	120
Precedentes históricos	121
Conclusiones de los estudios experimentales	123
LOS INTERFERONES	127
Perspectiva inicial	127
Variedades de Interferón	129
Síntesis celular y métodos de obtención	133
Acciones biológicas y mecanismos de acción	135
Actividad antiviral.....	135
Actividad antitumoral.....	136
Actividad inmunomoduladora.....	137
Farmacocinética y farmacodinamia	138
Estudios toxicológicos experimentales.....	138
Perfil farmacológico en el hombre.....	139
Experiencia clínica	140
Ensayos clínicos.....	141
Efectos adversos.....	142
2. HIPOTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO	144
HIPOTESIS	145
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	146
Principal	146
Secundarios	146
DISEÑO DE LA INVESTIGACION	147

3. MATERIAL Y METODOS.....	157
MATERIAL.....	158
Material inventariable.....	158
Material fungible.....	166
Animales de experimentación.....	167
METODOS.....	171
Procedimiento anestésico.....	171
Inducción de la endometriosis experimental.....	173
Estadaje de la endometriosis experimental.....	174
Valoración del crecimiento de los autotrasplantes endometriales.....	175
<i>Crecimiento por implante.....</i>	175
<i>Crecimiento por animal.....</i>	176
Valoración de las adherencias.....	177
Administración de los Interferones.....	183
Valoración de la respuesta al tratamiento.....	184
Procedimiento para el sacrificio.....	184
Registro de los datos.....	185
Análisis estadístico de los resultados.....	191
Relación de animales y laparotomías.....	192
4. RESULTADOS.....	194
Homogeneidad de los grupos.....	197
Primer experimento.....	206
Segundo experimento.....	217
Tercer experimento.....	235
Cuarto experimento.....	244

Quinto experimento.....	260
Comparación de los porcentajes de reducción por implante y por animal.....	269
5. DISCUSION.....	277
Sobre la endometriosis como materia de investigación.....	278
Sobre la hipótesis, los objetivos y el diseño experimental.....	281
Discusión de aspectos relacionados con los métodos.....	287
Discusión de los resultados.....	295
6. CONCLUSIONES.....	319
CONCLUSION PRINCIPAL.....	320
CONCLUSIONES ADICIONALES.....	320
7. BIBLIOGRAFIA.....	323



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

INTRODUCCION

La endometriosis es un proceso patológico frecuentemente invalidante y recidivante que ha suscitado, desde el inicio de su conocimiento hasta nuestros días, la atención de gran número de ginecólogos, fisiólogos, patólogos, embriólogos, biólogos, inmunólogos, epidemiólogos y genetistas.

Su interés radica en tres hechos fundamentales: La enorme frecuencia con la que prevalece en la población, las importantes repercusiones que entraña su padecimiento y el desconocimiento de los aspectos etiopatogénicos y fisiopatológicos que imposibilita la adopción de una terapéutica que resuelva, de forma permanente, la enfermedad.

Para el ginecólogo constituye un reto especial porque a la inclinación por desentrañar lo desconocido, une la necesidad diaria de encontrar una solución eficaz para sus pacientes. Quizás se trate de la patología ginecológica que más reflexiones suscite, que más decepciones provoque y que más interés despierte.

Como consecuencia de todo ello, las investigaciones sobre esta enfermedad han sido incesantes. El número de publicaciones aumenta en progresión geométrica y nuevos hallazgos están abriendo caminos importantes en el conocimiento de este proceso. Pero las palabras enigmática, misteriosa, oscura, controvertida, elusiva y frustrante todavía figuran entre los calificativos que utilizan la mayoría de los trabajos al referirse a la endometriosis. Ciertamente, aún se ignoran muchas cosas.

Pocas cuestiones en la enfermedad son unánimemente aceptadas. La mayoría de ellas permanecen sujetas a debate permanente. Revisaremos a continuación, profundizando en los temas controvertidos, los conocimientos actuales sobre los aspectos básicos de la endometriosis humana.

ENDOMETRIOSIS HUMANA

Concepto

Se define la endometriosis como un proceso morboso que se caracteriza por la presencia de endometrio (glándulas y estroma) en lugares distintos a la cavidad uterina. Este endometrio ectópico puede mantener un mayor o menor grado de diferenciación y, por lo tanto, una mayor o menor similitud histológica y funcional con el endometrio eutópico (1).

A este concepto clásico de la enfermedad habría que añadir alguna matización. Se ha de dotar a la definición de la idea de permanencia y desarrollo. Una laparoscopia realizada en el momento de la menstruación permitiría identificar, debido a la menstruación retrógrada, glándulas y estroma endometriales en la cavidad peritoneal en un gran número de mujeres. Eso, obviamente, no es una endometriosis.

Aunque la diferenciación hace referencia a la igualdad histológica, las células endometriales ectópicas pueden presentar diferencias histológicas (receptores hormonales), funcionales (secreción de proteínas) y antigénicas (codificación genética de moléculas de superficie), con las células endometriales eutópicas (2, 3).

El concepto de endometriosis ha permanecido definido de esta manera durante muchos años. Sin embargo, recientemente, debido a los datos proporcionados por la laparoscopia, algunos grupos de investigadores han propuesto un modelo diferente que distingue entre endometriosis como entidad fisiológica y lesión endometriósica como enfermedad. El desarrollo de esta hipótesis pertenece al grupo belga encabezado por Koninckx (4). Ellos postulan que las lesiones superficiales sutiles y no pigmentadas, como las vesículas blancas o rojas, las lesiones en llamarada y las polipoideas son las lesiones iniciales de

la endometriosis. Estas lesiones aparecerían de forma intermitente en una gran proporción de mujeres. Los mecanismos de defensa peritoneales funcionando adecuadamente controlarían y eliminarían dichas alteraciones en la mayoría de las pacientes. En algunas, el remodelado de estas lesiones daría lugar a formas superficiales típicas que pueden ser consideradas como cicatrices más que como implantes. Cuando los mecanismos inmunológicos presentan algún tipo de deficiencia, cualitativa o cuantitativa, temporal o permanente, congénita o adquirida, el remodelado no se produce y la endometriosis progresa hacia lesiones peritoneales profundas y endometriomas ováricos. Ambas situaciones son las que se consideran como auténtica enfermedad endometriósica que se asocia regularmente con sintomatología y cuya resolución espontánea ya no es posible. Por tanto, existiría una forma superficial fisiológica que no precisaría tratamiento y una forma profunda, auténtica enfermedad endometriósica, en que la intervención terapéutica sería necesaria. La idea de que en la misma endometriosis parecería como si se englobaran procesos patológicos distintos ha sido señalada también por otros autores (5).

Se distinguen, en orden a su localización, dos formas de endometriosis. La endometriosis interna o adenomiosis que consiste en la permanencia de tejido endometrial en el espesor del miometrio, y la endometriosis externa en la que el endometrio se sitúa fuera del útero. Debido a las radicales diferencias en todos los aspectos entre una y otra, ambas modalidades han pasado a considerarse como entidades distintas. Así, cuando hablemos de endometriosis de aquí en adelante, nos referiremos a la endometriosis externa. En la adenomiosis, por razones no bien aclaradas, el endometrio crece en profundidad y atravesando los haces musculares del miometrio se desarrolla en su espesor. Para poder hablar de adenomiosis la distancia que debe existir entre el endometrio normal y los focos de tejido endometrial en el espesor del miometrio es variable. Unos exigen un campo microscópico de gran aumento; otros dos campos de bajo aumento; otros opinan que al menos debe haber 2-3 mm, y otros finalmente opinan que los focos de endometrio ectópico deben profundizar al menos un tercio del espesor del miometrio (6).

Historia

La revisión de la historia de la medicina es a menudo considerada como un ejercicio académico, importante sólo para estudiantes o estudiosos de la disciplina. Aunque eso pudiera ser verdadero en términos generales, no es el caso de la endometriosis. La historia de la endometriosis no está cerrada; y permanecerá abierta hasta que se conozcan con exactitud su etiopatogenia, fisiopatología y tratamiento eficaz.

Aunque acreditados autores especulen que la enfermedad ha multiplicado su prevalencia con el desarrollo de la civilización (7, 8), hay motivos para pensar que la enfermedad existe desde siempre en la mujer. El principal argumento en favor de esta hipótesis lo constituye el conocido hallazgo de la presencia de esta enfermedad, de forma espontánea, en primates superiores que viven en un entorno salvaje, alejado de la civilización (9). La exhibición de una determinada característica en dos especies filogenéticamente contiguas hace suponer su permanencia en todos los eslabones evolutivos intermedios.

El Papiro de Ebers, que data del año 1600 A.C., contiene 47 diagnósticos específicos con encantamientos y recetas, reflejo de las enseñanzas y prácticas de Imhotep. La traslación literal de su texto revela lo siguiente: "Si tu examinas a una mujer que tiene dolor en un lado de su región hipogástrica, entonces tu dirás que ello es debido a un desorden en su menstruación. Después tu prepararás para ella cebolla triturada mezclada con serrín de pino y vendarás su región hipogástrica con ésto". Aunque este dolor debido a "desorden de la menstruación" podría ser ocasionado por un variado número de causas, ¿ No podría ser debido a una endometriosis en una mujer de la antigüedad?. Se pudiera pensar que la prescripción señalada constituye la primera conocida para el tratamiento de la endometriosis (10).

Se han recogido en escritos de las culturas Griega y Romana, así como de los pueblos Europeos que continuaron a estas, referencias de

complicaciones ginecológicas que cursaban con dismenorrea e infertilidad (11).

Acostumbran los tratados sobre el tema a atribuir la primera descripción escrita de lo que sin duda era una endometriosis a Von Rokitansky. Este autor en 1860 describió una forma infiltrante de la enfermedad que denominó "adenomyomata" (10). Pero la auténtica primera reseña de este proceso la realizó Cruveilhier, quién en 1835 en su libro de anatomía humana escribió sobre la existencia de quistes en los anejos, útero y vagina, formados a lo largo del curso de remanentes Wolfianos y Müllerianos (12).

En 1883, Diesterweg (13), publicó el caso de una mujer operada en dos ocasiones, dos años antes, por "pólipos" de la pared posterior uterina. El mayor de ellos tenía el tamaño de un puño. Estos tumores contenían quistes llenos de sangre y revestidos por un epitelio ciliado. Fue la descripción histológica más precoz de la enfermedad, pero el autor no identificó este epitelio como similar al de la cavidad uterina.

Detalladas descripciones de la estructura de los denominados por Rokitansky "Adenomyomata" fueron hechas por Von Recklinghausen en 1893, 1895 y 1896 (14, 15, 16). Él fue el primero en distinguir entre adenomyomas uterinos y extrauterinos. Sin embargo, desde su punto de vista, sólo los casos situados en la pared uterina poseían glándulas derivadas de la mucosa uterina.

Iwanoff reclamó para sí el mérito de haber sido el primero en describir un adenomioma. En los comentarios de un caso publicado por él en 1898 (17), señaló que con mucha anterioridad había realizado una publicación en Rusia con una evaluación microscópica de las glándulas encontradas en un mioma quístico. Desafortunadamente, no aportó la referencia de su temprana publicación. Iwanoff además puntualizó que las glándulas encontradas en su tumor derivaban del epitelio seroso (Metaplasia serosa).

El término "quiste de chocolate" fue empleado por Breus en 1894 para describir una tumoración situada en el fondo de saco de Douglas entre la

cara posterior del útero y la anterior del recto (12).

En la Universidad Johns Hopkins de Baltimore, a finales del siglo pasado, trabajaba como asociado W.W. Rusell. A este autor se le atribuye la primera comunicación de una endometriosis ovárica. Señaló el caso de una mujer premenopáusica, operada de un adenocarcinoma quístico del ovario izquierdo, que presentaba múltiples adherencias entre el ovario derecho y la cara posterior del ligamento ancho. Pese a que a simple vista no notó nada anormal en dicho ovario, que era de tamaño normal, se quedó atónito cuando en el exámen microscópico encontró áreas que eran un prototipo exacto de las glándulas y del tejido conectivo interglandular uterinos. No obstante, en contraste con la precisión de su descripción histológica, consideró que el tumor era debido a la presencia de porciones aberrantes del conducto Mülleriano en el ovario (18). Otras comunicaciones de endometriosis ovárica siguieron a ésta (19-25). Todas ellas tienen la característica común de no haber reconocido la similitud de su epitelio con el epitelio uterino, o haber atribuido su presencia a origen Wolfiano o a la presencia de restos Müllerianos en el epitelio germinal del ovario (Teoría embriológica de Waldeyer).

El otro ilustre patólogo a quién se ha relacionado de forma universal con esta enfermedad, además de defender la teoría que lleva su nombre sobre la histogénesis de este padecimiento, describió probablemente el primer caso de endometriosis secundaria. Meyer presentó el caso de una paciente a quién se sometió a una segunda laparotomía debido la aparición de grandes dolores pélvicos siguiendo a una ventro fijación uterina. Pudo encontrar glándulas epiteliales alrededor de las ligaduras de seda empleadas en el procedimiento inicial. Meyer entonces, con asombrosa claridad, elaboró su teoría de la "Heterotopia epitelial" o metaplasia inflamatoria del epitelio celómico. Consideró que los implantes endometriósicos eran una invasión epitelial de los tejidos que presentaban un infiltrado inflamatorio. De este modo se trataba de una especie de proceso curativo, resultado final de una inflamación pélvica. También concluyó que dicha "Heterotopia epitelial" podía realizarse con epitelio distópico (inmaduro o embrionario) o con epitelio ortotópico (maduro) (26). La enorme

autoridad de este autor, decano de los patólogos de la época, tuvo una gran trascendencia. Hasta la aparición de la publicación de Sampson en 1921, fue la teoría sobre la histogénesis de la endometriosis mayoritariamente aceptada. Aún muchos años después, incluso en nuestros días, esta teoría nunca demostrada tiene sus defensores entre ciertos patólogos (27).

La descripción más ilustrativa y más próxima a la enfermedad como la conocemos hoy la realizó Smith en 1920 (28). Menciona una mujer con dismenorrea severa, presencia de adherencias y una masa blanda fijada en el fondo de saco; el escape de un fluido con aspecto de chocolate durante la liberación de las adherencias del ovario, la presencia de numerosos pequeños quistes en el ovario conteniendo material oscuro y una destacable desaparición del dolor tras la cirugía de exéresis. De nuevo falló en el exámen histológico; su diagnóstico fue quiste hemorrágico del ovario.

El origen y naturaleza de los elementos glandulares encontrados en los "Adenomyomata" centró la controversia en la historia temprana de la enfermedad. Hay pocas dudas respecto a que el primer científico que llamó la atención sobre el hecho de que las inclusiones glandulares encontradas en los "Adenomyomata" derivaban de la membrana mucosa del útero, fue T.S. Cullen (29).

T.S. Cullen (1868-1953) nació en Bridgewater, Ontario (Canadá). Hijo de un clérigo, se graduó en medicina en 1890 en la Universidad de Toronto, e hizo el internado en el Hospital General de Toronto. Kelly, que había pasado unas vacaciones pescando en Canadá, realizó una operación en Toronto en la que tuvo a Cullen de ayudante, quién quedó tan impresionado por la habilidad de Kelly que en 1891 hizo su segundo internado en el servicio del Dr. Howard Kelly en el Johns Hopkins, donde fue profesor de ginecología clínica hasta 1939. En su haber se encuentra la primera descripción de la hiperplasia endometrial clínica y patológica y en 1922 describió el signo que ha pasado a la posteridad con su nombre (coloración azulada del ombligo debida a la presencia de sangre en la cavidad peritoneal. Por ejemplo en pancreatitis o rotura de un embarazo

ectópico). Publicó un libro "The Umbilicus and its diseases" y numerosos artículos. Sus primeras observaciones sobre los "Adenomyomata" las hizo en 1894 y las publicó en 1896. Cullen mencionó que cerca de 100 casos de "Adenomyomata" habían sido descritos antes de su publicación (30).

Fue el trabajo de Cullen el que forzó a algunos investigadores a reconocer que los "Adenomyomata" contenían epitelio uterino, estroma y glándulas. En 1903, este autor publicó 19 casos más (31). Mediante un cuidadoso exámen consiguió determinar que en la mayoría de los casos las glándulas derivaban del epitelio de revestimiento de la cavidad uterina. En 1919 Cullen leyó un resumen en el Congreso anual de la Sociedad Médica del estado de Nueva York, en el cual señaló, una vez más, que todos los "Adenomyomata" consisten en una matriz de músculo no estriado y tejido fibroso con grupos glandulares o glándulas aisladas, a veces en contacto con el músculo o generalmente en un estroma característico. Estas glándulas recuerdan en cada caso particular a aquellas encontradas en la mucosa del cuerpo del útero. Él predijo que pronto se tendría una idea completa de la histogénesis de los "Adenomyomata" (32). Éso ocurrió solo dos años después cuando Sampson publicó en 1921 sus observaciones y dibujó el cuadro completo que Cullen había invocado.

Como indican Benagiano y Brosens (29), es costumbre considerar a Sampson como el descubridor de la endometriosis; y verdaderamente su trabajo sobre los endometriomas ováricos aportaron la primera teoría demostrable sobre la etiopatogenia de la enfermedad. Pero es, sin embargo, un engaño de la historia que la gran contribución de Cullen al conocimiento de esta entidad nosográfica sea ordinariamente ignorada por todos.

Entre los años 1921 y 1927 J.A. Sampson, un ginecólogo dedicado a la práctica privada en Albany (Nueva York), realizó tres publicaciones que sentaron las bases de la llamada teoría implantativa (33, 34, 35). En estos artículos ya usó el término endometriosis, recordando que las dos mejores expresiones para denominar a esta enfermedad eran la de Mullerianosis, sugerida

por Bailey, y la de endometriosis que propuso Blair Bell.

En el enunciado de su hipótesis se mostró convencido de que la menstruación retrógrada era la causa más frecuente de las lesiones endometriósicas. Señaló que la sangre refluida contenía fragmentos endometriales y, menos frecuentemente, de la mucosa tubárica que podrían implantarse en la superficie peritoneal. También contenido menstrual podría pasar a la cavidad libre desde lesiones endometriósicas previas o rotura de endometriomas ováricos.

Respecto a la teoría metaplásica de Iwanoff-Meyer, admitió la posibilidad de que éso ocurriese en alguna ocasión, aunque él nunca pudo comprobarlo. Manifestó sus dudas respecto a que una mucosa típica uterina pudiera formarse exclusivamente por metaplasia celómica.

Argumentó su teoría en base a hechos observados que resumió de la siguiente manera:

1. La estructura histológica y funcional de los implantes endometriósicos es similar a la de la mucosa uterina.
2. Ocurre en mujeres durante su vida menstrual y no en hombres.
3. Se ha observado en intervenciones quirúrgicas la existencia de menstruación retrógrada y la presencia de epitelio y estroma endometriales en ella.
4. Se ha encontrado en lugares declives dentro de la pélvis; zonas a donde caería la sangre refluida a través de las trompas. Frecuentemente es bilateral.
5. Las lesiones a menudo están en diferentes estados de desarrollo, lo que sugiere la presencia de implantaciones repetidas.
6. La relación de los implantes entre sí, indica que unos pueden derivar de otros o que ambos tienen el mismo origen.

7. Las trompas son habitualmente permeables, y aunque no lo fuesen, esto podría deberse a una oclusión posterior al inicio de la enfermedad.
8. El estudio histológico de peritonitis bacterianas no ha podido demostrar que este estímulo infeccioso-irritativo cause lesiones endometriósicas.
9. Los depósitos endometriales son habitualmente múltiples y se encuentran esparcidos, sugiriendo que la irritación química de la sangre menstrual sólo no es la responsable.
10. Se ha observado endometriosis en cicatrices de cesáreas, apoyando la contaminación del campo con tejido uterino.
11. Se ha conseguido crear endometriosis experimental por autotrasplante de mucosa uterina.

Con relación a los endometriomas, postuló su origen en la invasión de quistes o folículos rotos por contenido menstrual refluído. El hecho de que estos endometriomas alcanzasen los mayores tamaños lo relacionó con el hecho de que el ovario fuese un huesped mejor adaptado para su desarrollo. Pensó que el ovario era un huesped incubador intermedio, de modo que al romperse contribuiría a la diseminación y a la adherencia del ovario a los órganos adyacentes.

La teoría implantativa de Sampson ganó popularidad con los años, a medida que sus argumentos iban siendo demostrados. El propio Meyer en su autobiografía señala: "No debemos olvidar el impulso que nos dió la teoría de Sampson de la endometriosis. En el trabajo de un hombre, son más importantes los estímulos y las perspectivas que crea en otros, que las concepciones propias que establece. Es verdad que yo ahora he cambiado mi pensamiento con respecto a la cuestión de la endometriosis" (36).

No obstante, los años siguientes al enunciado de la teoría

implantativa vinieron marcados por apasionadas discusiones entre los partidarios de esta teoría y los defensores de la teoría metaplásica. Fueron famosas las disputas entre Novak y Sampson. Novak apuntó que el material menstrual expulsado era necrótico, debido a la acción de enzimas proteolíticas, y sus constituyentes estaban autolisados. No existía posibilidad de que las células del contenido menstrual vivieran y crecieran por ellas mismas (37).

Aunque Sampson nunca renunció a su creencia acerca del origen transtubárico de la endometriosis, acosado por los ataques de eminentes científicos, resumió pronunciando la famosa y célebre afirmación: "Si fragmentos de mucosa mulleriana transportados con la sangre menstrual a la cavidad peritoneal están siempre muertos, la teoría de la implantación, tal y como ha sido presentada por mí, también estará muerta y debe ser enterrada y olvidada. Pero si alguno de estos fragmentos están, incluso ocasionalmente, vivos, la teoría de la implantación también estará viva".

Por la misma época en que Sampson daba a conocer sus ideas, Halban elaboraba la hipótesis de la endometriosis como enfermedad con capacidad metastásica (38). Se basó para ello en los hallazgos de Werthein, Meyer y él mismo, que encontraron endometriosis en ganglios linfáticos parametrales, inguinales y sacros. Otros autores también postularon que la enfermedad podría utilizar los vasos venosos para diseminarse; y el hallazgo posterior de focos de endometriosis en pulmones y otros órganos distantes de la pélvis vino a confirmarlo (39).

El avance en el conocimiento de esta enfermedad durante los años siguientes continuó a través de dos caminos diferentes. Por un lado se realizaron estudios, en la mujer y experimentales, para tratar de comprobar la veracidad de las teorías sobre la histogénesis de la enfermedad. Por otro lado se investigó en el campo terapéutico, pues en el terreno clínico ya se había comprobado la persistencia e insidiosidad de las lesiones en las pacientes que las padecían.

Siguiendo el camino de la histogénesis, Watkins en 1937 (40) aspiró

el contenido del fondo de saco de Douglas mediante culdocentesis, en pacientes que estaban menstruando, y encontró células rojas, leucocitos, células endometriales y material amorfo. Era obvio que células endometriales habían atravesado las trompas de Falopio hasta la cavidad peritoneal en un desplazamiento antiperistáltico y anticiliar.

El crecimiento de tejido endometrial humano *in vitro* fue documentado por Hirsch y Jones en 1933 (41). Estos autores transfirieron delgadas piezas de endometrio, de 2-4 mm, a un medio compuesto por plasma heparinizado, obtenido de mujeres postparto, y extracto de tejido formado por machacamiento de endometrio en solución de tiroides (plasma y extracto a partes iguales). Las muestras endometriales se tomaron de mujeres entre 20 y 65 años. Todos los cultivos sobrevivieron entre 10 y 40 días (tiempo de observación del estudio), aunque sus dimensiones se redujeron a 1-2 mm. El tejido superviviente de los explantes fue fundamentalmente epitelio (41).

En 1951, Keettel y Stein encontraron que fragmentos de endometrio obtenidos del fluido menstrual habían crecido en cultivo tisular utilizando un medio natural (42). La cuestión que faltaba por precisar era si el grado de viabilidad de estas partículas descamadas era suficiente para implantarse y sobrevivir tanto tiempo como para provocar endometriosis. Esto fue demostrado mediante dos investigaciones independientes, una en animales y otra en humanos.

TeLinde y Scott, en el Hospital Johns Hopkins de Baltimore (Maryland), discípulos y seguidores de Novak, diseñaron un estudio experimental con monas para demostrar que la teoría de la menstruación retrógrada de Sampson no era cierta (43). De forma muy ingeniosa separaron el cérvix de la vagina y cerraron ésta. Voltearon el útero, haciendo que la sangre menstrual cayera directamente en la cavidad peritoneal. Por otro lado, autotrasplantaron quirúrgicamente endometrio en cavidad peritoneal de otras monas. Hallaron implantes con glándulas y estroma en todas las monas autotrasplantadas, entre 26 y 522 días de observación. De igual modo, encontraron endometriosis en 5 de 10 animales a los que se había provocado menstruación intraperitoneal, entre 75

y 963 días de observación. Estos experimentos probaron que en la mona adulta el endometrio descamado en la menstruación es viable, capaz de crecer y de producir lesiones en la pélvis similares a las encontradas en la endometriosis humana. La posibilidad de metaplasia causada por la irritación quirúrgica peritoneal o sangre menstrual fue poco probable, ya que en los estudios de autotrasplante no se desarrolló endometriosis a pesar de la cirugía y caída de sangre en otros lugares que no fueran los de la implantación. Estos resultados hicieron cambiar su pensamiento a los autores y defender en adelante la teoría de Sampson. En la discusión generada por el artículo, en la que también se encontraba Novak, TeLinde refiere textualmente un párrafo de Novak dirigido a Sampson en 1926: "La teoría de Sampson se vería fortalecida si él pudiera demostrar dos cosas. Primero, la capacidad de las células descamadas de crecer en cultivos. Segundo, la capacidad del endometrio de crecer en peritoneo u ovario humanos o de animales inferiores. Ambas pruebas faltan y por las innatas dificultades yo me inclino a creer que será muy difícil probar cada punto experimentalmente".

Finalmente, Ridley y Edwards en 1958 (44) recogieron fluido menstrual durante las primeras 24 horas de la menstruación, sin trauma y sin invadir la cavidad endometrial. Implantaron estos elementos en la pared abdominal baja, en situación supraaponeurótica, donde las observaciones y la subsecuente excisión pudo ser hecha. Encontraron implantes endometriósicos en 2 de 15 casos, entre 91 y 175 días. Hubo cuatro casos más que mostraron reacción tisular sugiriendo que se había formado endometriosis, pero no reunían los criterios de crecimiento establecidos en el diseño. Todavía hoy, no sabemos por qué algunas pacientes permiten que se forme endometriosis y otras no, bajo similares circunstancias. Pero la conclusión de este trabajo en humanos fue que estas células descamadas resultaron viables y capaces de establecer endometriosis en lugares ectópicos del huesped.

Así, la teoría de Sampson fue un hecho probado, mostrando que su creencia era válida y que su teoría está viva. Nunca ha sido demostrada la teoría metaplásica, a pesar de contar en todas las épocas con partidarios.

Desde el punto de vista terapéutico, hasta los años 40, la única modalidad empleada fue el tratamiento quirúrgico. Las primeras descripciones y hallazgos de esta enfermedad se realizaron sobre piezas extirpadas quirúrgicamente. La cirugía se limitó en los primeros momentos a la extirpación del tejido visualmente anormal, algo que parece lógico. Con nuevos conocimientos clínicos que señalaban una enorme facilidad de la enfermedad para recurrir después de su extirpación, tomaron su lugar los tratamientos de exéresis radical (45).

El tratamiento quirúrgico conservador, una forma de tratamiento cuyo empleo de forma generalizada es una adquisición relativamente reciente, tuvo sus precedentes muy precozmente (46).

Desde que la enfermedad quedó caracterizada, se observó que era típica de la edad fértil y que las pacientes mejoraban notablemente con los embarazos y tras la menopausia. Ello hizo suponer que la manipulación hormonal pudiera disminuir la sintomatología y evitar la progresión de la enfermedad. No obstante, hubo de esperarse a la disponibilidad de preparados hormonales en formas galénicas adecuadas para su uso clínico (47). De este modo, el tratamiento hormonal de la endometriosis se inició en la segunda mitad de los años cuarenta con el empleo del dietilestilbestrol. Éste se administraba de forma continua y a altas dosis, con la doble intención de producir una decidualización del estroma y de inhibir la ovulación y la esteroidogénesis ovárica. Sin embargo, no se conseguía la necrosis de los implantes sin el empleo de gestágenos; y, además, el estímulo estrogénico, aún anulando la esteroidogénesis ovárica, producía por sí mismo un aumento del tamaño de los implantes y progresión de la enfermedad. Su utilización de esta forma tenía importantes efectos secundarios (nauseas, vómitos, edemas, mastodinia, tromboflebitis y hemorragias uterinas) (48, 49).

También durante los años cuarenta se comenzaron a utilizar los andrógenos como la metiltestosterona. Usados a bajas dosis tenían una acción favorable sobre la endometriosis. No estimulaban el tejido endometríaco como

los estrógenos y no llegaban a inhibir la ovulación. Su inconveniente fueron los efectos secundarios virilizantes, como hirsutismo, acné, desarrollo del clítoris y cambios de la voz (50, 51).

En 1953 Meigs sugirió un medio de profilaxis contra la endometriosis; el matrimonio y la gestación tempranas. Sin embargo, en muchas pacientes con la enfermedad esto no era posible, porque o no deseaban el embarazo (en aquella época era sinónimo de matrimonio), o eran infértiles. Reflexionando sobre las recomendaciones de Meigs, Kistner en 1958 (52) trató a 12 pacientes con una combinación de altas dosis de estrógenos y dos "nuevas" progestinas (Caproato de 17-alfa-hidroxiprogesterona y Noretinodrel). Se produjo decidualización en el endometrio de todas las mujeres y en los tejidos endometriósicos de las pacientes a las que operó al finalizar el tratamiento. Nueve de las doce mujeres tratadas mejoraron objetiva y subjetivamente. Creó el término de "Pseudoembarazo" para denominar a esta forma de tratamiento que se mantendría durante muchos años.

El grupo de Dmowski, en Chicago (Illinois), publicó en 1971 los resultados obtenidos, tanto experimentalmente como en humanos, con un derivado sintético de la 17-alfa etinil testosterona (Danazol) (53). Sus resultados demostraron que la sustancia tenía efectos inhibidores de la función gonadal, así como efectos androgénicos y anabólicos. En la mujer se anuló o redujo la actividad estrogénica y no hubo evidencia de ovulación. Desapareció el pico de LH y FSH de la mitad del ciclo. Estos efectos fueron reversibles y confinados al periodo de tratamiento. La función gonadal se recuperó de nuevo en todos los casos al finalizar el tratamiento. En este trabajo ya se señalaron la pubertad precoz, endometriosis, hipertrofia mamaria juvenil y mastopatía fibroquística como indicaciones para el fármaco. Danazol comenzó a usarse en Europa y fue aprobado por la FDA (Foods and Drugs Administration) Norteamericana en 1976. Las mujeres fueron muy reacias a aceptar el tratamiento después de la amplia información divulgada sobre los efectos en la descendencia femenina de madres tratadas durante el embarazo con dietilestilbestrol (54).

Al comienzo de los años 80 se iniciaron dos avances muy importantes en el conocimiento y en el manejo de la endometriosis.

Simultáneamente, en el año 1982, dos grupos de investigadores comunicaron, por primera vez, el empleo de un agonista de la Gn-RH para el tratamiento de mujeres con endometriosis. El grupo de Los Angeles, encabezado por Meldrum (55), señaló que la secreción estrogénica ovárica fue inhibida completamente en 5 mujeres con endometriosis, mediante inyecciones diarias del agonista. Sugirieron que se trataba de un nuevo acercamiento terapéutico de máxima eficacia para la enfermedad. Al mismo tiempo, el grupo de Lemay, en Québec (56), publicó los datos hormonales y clínicos de una paciente que sufría endometriosis pélvica y se trató con administraciones repetidas intranasales de Buserelin. Mediante laparoscopia se cuantificó la extensión previa de la enfermedad. Con tres aplicaciones del spray cada 12 horas, durante 173 días, se comprobó, mediante nueva laparoscopia a la finalización del tratamiento, una respuesta casi completa. La paciente estuvo libre de síntomas durante los cuatro meses siguientes a la finalización del tratamiento. Sin embargo, una tercera laparoscopia ocho meses más tarde mostró grandes adherencias entre el útero y el Douglas. Los ovarios eran quísticos y estaban adheridos a la cara posterior del ligamento ancho. Terminó realizándose una histerectomía con doble anexectomía. Los editores de la revista en que se publicó este caso, hicieron el siguiente comentario final: "Este reportaje es todavía demasiado preliminar y deben ser evaluados bastantes más pacientes antes de que se obtenga alguna conclusión sobre la eficacia de los agonistas de la Gn-RH, especialmente en comparación con otras terapias existentes".

Los años 80 también abrieron un nuevo horizonte en el conocimiento de la fisiopatología de la endometriosis. Ya demostrada la teoría de la menstruación retrógrada en la histogénesis de la enfermedad, y conocido el hecho de que la regurgitación menstrual transtubárica ocurre en el 90% de las mujeres con trompas permeables (57), faltaba por conocer qué circunstancias facilitaban el asentamiento y proliferación del tejido endometrial refluído en unas mujeres, o su lisis y eliminación en otras.

El sistema inmunológico, que actúa de forma fisiológica reconociendo y destruyendo agentes infecciosos exógenos, células extrañas y células propias aberrantes, seniles o ectópicas, tenía que estar implicado en este proceso.

Fue Startseva quien en 1980 demostró, por primera vez, un déficit inmunitario celular junto a una hiperreactividad de la inmunidad humoral en mujeres con la enfermedad (58). Desde ese momento hasta hoy han sido incesantes las publicaciones que han reconocido algún tipo de perturbación en la delicada y compleja fisiología del sistema inmune. Básicamente, parece probada la existencia de una disminución de la inmunidad celular, tanto a nivel sistémico como en la cavidad peritoneal (59). También se ha demostrado una disminución de la actividad citolítica de las células NK (asesinas espontáneas) frente a células endometriales (60). La existencia de autoanticuerpos organoespecíficos e inespecíficos ha evidenciado una exaltación de la inmunidad humoral (61). El fluido peritoneal de mujeres con endometriosis presenta un aumento tanto del número como de la activación de los macrófagos (62).

Otros estudios han identificado alteraciones locales a nivel de las citocinas (linfocinas y monocinas), entre las que se encuentran las interleukinas y los Interferones (63). Alteraciones a nivel de los factores de crecimiento (64), y a nivel de las llamadas moléculas de adhesión celular o Integrinas (65).

La dificultad actual consiste en encontrar y demostrar un razonamiento fisiopatológico que enlace cada uno de estos hallazgos en el lugar y en el tiempo en el que ocurren. Es decir, que se delimite lo que es causa y lo que es consecuencia. Hasta que no se resuelvan dichas dudas continuaremos entre sombras.

Tozzini (66), de forma literariamente brillante, define el estado actual del conocimiento de la enfermedad así: "¿Dónde reside la verdad en esta afección, patrimonial casi exclusivamente de la mujer desde el punto de vista filogenético?. ¿Será como la esfinge, femenina e indescifrable?. Las

investigaciones llevadas a cabo en la última década han derribado parte del muro por donde se filtra nueva luz, pero aún muchas preguntas quedan sin respuesta. La endometriosis hoy sigue siendo un enigma".

Epidemiología

Distribución de la endometriosis

Para conocer la distribución de la enfermedad hemos de basarnos en los estudios realizados sobre incidencia y prevalencia.

La prevalencia es la proporción de enfermos, tanto nuevos como antiguos, en una población determinada y en un momento concreto. La validez de su cálculo depende fundamentalmente de la representatividad de la muestra estudiada y de la uniformidad de la metodología diagnóstica empleada.

En la endometriosis el cálculo de la prevalencia es una tarea sumamente difícil por dos razones. La primera de ellas es que los métodos diagnósticos han variado a lo largo del tiempo, haciendo imposible la comparación de estudios pertenecientes a distintas épocas. Pero también la capacidad diagnóstica depende de la dotación técnica de la institución que realiza el estudio y de la experiencia de los investigadores en la interpretación de imágenes dudosas, como las sutiles o no pigmentadas. La segunda razón que limita el valor de los datos publicados sobre la prevalencia de la endometriosis, radica en la inadecuada elección de la muestra estudiada. Puesto que el diagnóstico implica la realización de un acto quirúrgico, la indicación por la que se propone dicho acto modifica la prevalencia de la enfermedad (6, 67)).

En 16 series recopiladas a lo largo de 60 años, la prevalencia de la endometriosis varió entre 0 y 52.9%, en mujeres sometidas a intervención

quirúrgica (68). Cuando los casos son subdivididos por la indicación, observamos que en pacientes infértiles sometidas a laparoscopia la prevalencia oscila entre el 2.1% (69) y el 34.6% (70). En mujeres operadas por algias pélvicas crónicas encontramos entre un 4.5% (71) y un 52.8% (72). En mujeres asintomáticas, fértiles, sometidas a laparoscopia para ligadura tubárica se encontró endometriosis en un porcentaje variable entre el 1.3% (73) y el 42.6% (74).

Estudios más amplios, generalmente multicéntricos, que tratan de analizar la prevalencia global de la enfermedad (Incluyendo varias indicaciones y procedimientos quirúrgicos) merecen ser comentados individualmente.

Wheeller y Malinak (75) hacen uno de los estudios más amplios, revisando datos de 21 ginecólogos entre 1976 y 1984. En total analizan 25.440 intervenciones ginecológicas entre las que hallan 3473 casos de endometriosis, es decir un 13.5%.

Mahmood y Templeton (76) escogieron prospectivamente un grupo de 1542 mujeres caucásicas para investigar cuidadosamente la prevalencia de endometriosis. La distribución según técnica quirúrgica e indicación fue la siguiente: Laparoscopia por infertilidad (N= 654), laparoscopia para esterilización (N= 598), laparoscopia por algias pélvicas crónicas (N= 156) y laparotomía para histerectomía por hemorragia uterina no controlable con tratamiento médico (N= 134). Encontraron una prevalencia global del 15%. Por indicaciones, mencionan: Infertilidad 21%, esterilización 6%, algias pélvicas crónicas 15% y hemorragia uterina 25%.

Más recientemente, Parazzini y cols. (77) estudian la prevalencia de endometriosis en 23 departamentos de Ginecología de Italia, entre Mayo de 1991 y Julio de 1992. En total, entraron en el estudio 3.648 mujeres sometidas a cirugía por esterilidad (660 casos), algias pélvicas crónicas (409 casos), miomas (1880 casos) y quistes benignos de ovario (735 casos). Diagnosticaron endometriosis en el 30% de las intervenidas por esterilidad, en el 45% de las algias pélvicas, en el 12% de los miomas y en el 35% de los quistes de ovario.

La prevalencia global en toda la muestra fue del 23.2%.

La incidencia se define como el número de casos nuevos de una determinada enfermedad en una población específica durante un tiempo dado.

Los datos sobre la incidencia de la endometriosis son extremadamente limitados. En 1987, Houston y cols. (78) examinaron la incidencia de nuevos diagnósticos de endometriosis pélvica en mujeres blancas de 15 a 49 años en Rochester, Minesota, desde 1970 hasta 1979. Señalan una incidencia de 2.5 casos por 1000 mujeres y año.

Otra estimación de la incidencia de endometriosis en la población general está contenida en un estudio de los diagnósticos al alta, tras ingreso por patología aguda, realizado en Hospitales Americanos no federales en 1980 (79). El porcentaje anual de ingresos hospitalarios con la mención de endometriosis en la lista de diagnósticos por paciente fue de 27 por 10.000 mujeres de todas las edades y 40.6 por 10.000 mujeres de 19 a 45 años de edad. La enfermedad estuvo virtualmente ausente en niñas por debajo de 15 años y en mujeres por encima de 65 años. Estas incidencias fueron de la misma magnitud que las de mioma uterino o prolapso genital; y significativamente mayores que la de cáncer de mama.

Una estimación racional de la incidencia nos llevará a un cálculo seguro de la prevalencia. Si sabemos que la prevalencia es aproximadamente igual a la incidencia multiplicada por la duración promedio de la enfermedad, y si asumimos que la incidencia de la endometriosis es de 2.5 / 1000 mujeres / año y la duración promedio de la enfermedad 40 años, la prevalencia de la endometriosis en la población general sería del 10% de todas las mujeres (67).

Edad, raza y estado socioeconómico

Al margen de escasas y anecdóticas excepciones, la enfermedad se desarrolla entre la menarquía y la menopausia. Al no disponer de estudios longitudinales, las prevalencias de la enfermedad en las distintas edades no permiten extraer conclusiones válidas acerca de su carácter progresivo, ya que la edad de comienzo es muy variable.

En el estudio de Houston (78), la menor incidencia se produjo entre los 15-19 años (7/10.000/año). Desde entonces la frecuencia aumenta progresivamente hasta los 44 años (41/10.000/año), y a partir de ahí declina, siendo la incidencia entre los 45-49 años (20/10.000/año).

Parece por tanto que la incidencia de la endometriosis aumenta con la edad hasta los 44 años, pero no hay asociación entre edad y severidad de la misma.

Aunque las publicaciones relacionadas con la prevalencia racial de la enfermedad adolecen de importantes defectos de forma, como no haber tenido en cuenta el nivel socioeconómico, la edad o la paridad, indican diferencias importantes entre las mujeres negras, blancas y orientales. Dos trabajos encuentran una prevalencia en mujeres negras de la mitad que en las blancas (73, 80). En mujeres orientales la prevalencia sería incluso mayor que en blancas (81).

Ya en el año 1942 Meigs (82) enfatizó la importancia de los factores socioeconómicos en el riesgo de padecer endometriosis. Él observó una mayor frecuencia de diagnósticos en sus pacientes privadas que en las de distrito (consulta benéfica), presumiblemente de nivel socioeconómico más bajo. Otros trabajos posteriores (80, 83), comparando pacientes de diferentes estratos sociales y el mismo grupo racial, también encontraron una correlación positiva entre nivel socioeconómico más alto y riesgo de enfermedad.

Factores familiares y genéticos

La descripción de familias con endometriosis ha sido una observación de varios autores (84, 85, 86). En un estudio genético, Simpson y cols. (87) encontraron que 18 (14.6%) de 123 mujeres con endometriosis tuvieron una madre y/o una hermana con la enfermedad, pero sólo 2 (1.6%) de estas mismas mujeres tuvieron una suegra y/o una cuñada con endometriosis. La mujer con endometriosis familiar parecía tener formas más severas de la enfermedad. Podríamos estimar en base a este estudio que la historia familiar de endometriosis incrementaría diez veces el riesgo de padecerla. Sin embargo, no se ha podido identificar un patrón específico mendeliano, postulándose una herencia poligénica multifactorial (67).

Se ha sugerido un posible mecanismo genético (o por lo menos congénito) en los casos que asocian endometriosis con anomalías genitales, incluyendo atresia cervical o vaginal y defectos müllerianos de fusión con obstrucción del flujo menstrual (88). Estos defectos parecen tener una tendencia familiar y pueden ocurrir con una frecuencia de cerca del 0.1% (89).

Buttram consideró que la frecuencia de retroversiones uterinas era la misma en mujeres normales y estériles, en las que la endometriosis era muy frecuente (90). Pero Moen puso de manifiesto que casi la mitad de las mujeres con endometriosis asintomática tenían retrovertido el útero, comparadas con el 17% de los controles (91).

Factores menstruales

Mientras la dismenorrea es un reconocido síntoma de endometriosis, se ha sugerido la posibilidad de que esta característica menstrual pueda preceder y posiblemente predisponer al padecimiento de esta enfermedad. La dismenorrea

se origina por un aumento de la génesis de prostaglandinas intrauterinas que incrementan la contractilidad del órgano. Dicha contractilidad incrementada podría favorecer la aparición de un mayor reflujo tubárico menstrual con el consiguiente aumento del riesgo de padecer endometriosis (92, 93).

En los estudios más recientes (93, 94), las características menstruales de las pacientes con la enfermedad han mostrado diferencias estadísticamente significativas con relación a los controles sanos. Así, se ha encontrado una menarquía más temprana, unos ciclos más cortos, menor incidencia de opsomenorrea y mayor duración y cuantía del sangrado.

Hormonas endógenas

Parece evidente la conexión entre baja paridad y endometriosis (94). No obstante, un problema adicional al definir esta asociación es que la enfermedad causa esterilidad e infertilidad "per se", siendo muy difícil distinguir si la disminución de fertilidad precede o sigue a la endometriosis.

Las mujeres obesas tienden a tener mayores niveles estrogénicos, entonces, se podría señalar a la obesidad como factor de riesgo para la endometriosis. Sin embargo, contrariamente a la idea previa, varios trabajos resaltan que la enfermedad se da más frecuentemente en mujeres con peso por debajo de lo normal (95, 96). En otro estudio, casi la mitad de las pacientes con endometriosis tuvieron talla corporal mayor de 166 cm, mientras dicha condición se presentó en sólo un tercio de los controles (97).

Un grupo de mujeres constituido por fumadoras desde los 17 años y que consumían más de 20 cigarrillos al día presentó un menor riesgo de padecer la enfermedad (Riesgo relativo 0.5, $p < 0.05$) (97). Esta asociación es biológicamente posible en vista de la observación de que el hábito tabáquico reduce los niveles estrogénicos endógenos (98).

Las mujeres que hacen ejercicio regular también tienen un significativo menor riesgo de endometriosis que las mujeres que no lo hacen. En el estudio de Cramer (97), 33% de los sujetos control dijeron que hacían ejercicio regularmente comparado con el 24% de los pacientes (Riesgo relativo 0.6, $p < 0.001$). De nuevo, el ejercicio es otro hábito que se sabe afecta los niveles estrogénicos endógenos. Cuando se realiza de forma regular disminuye los niveles de estradiol en las fases folicular y lútea. El grado del cambio parece correlacionarse con la intensidad del ejercicio y la edad de las practicantes (99).

De forma similar, la exposición a otros factores podría afectar al riesgo de endometriosis a través de su capacidad de alterar los niveles hormonales endógenos. Estos incluirían factores dietéticos y drogas que pueden afectar al metabolismo estrogénico en el hígado, como Fenobarbital o alcohol (67).

Hormonas exógenas

Se demostró que el mantenimiento de implantes endometriales en monos castrados fue dependiente de hormonas sexuales (100). Dicha dependencia es también evidente en humanos y viene sugerida por la observación de la ausencia de la enfermedad en niñas menores de 15 años o mujeres mayores de 65 años. Sabemos, del mismo modo, que la terapia hormonal sustitutiva en la menopausia puede activar la enfermedad (101).

De mayor interés es el papel que los contraceptivos orales pueden desempeñar en esta enfermedad. Como los contraceptivos orales disminuyen el flujo menstrual, los expertos han sugerido que "la píldora" podría ofrecer profilaxis contra el desarrollo de la endometriosis (102). Un problema obvio en el estudio de la asociación entre endometriosis y uso de "la píldora", es que las mismas características menstruales que predisponen a la endometriosis (dismenorrea, menorragia etc...) son también indicaciones comunes para los

contraceptivos orales.

Factores inmunológicos

Anteriormente ya hemos señalado que el grueso de la investigación en los últimos años, con relación a esta enfermedad, se ha centrado en los aspectos inmunológicos de la misma; y que en ese sentido se han logrado avances importantes, corroborados por varios autores.

Además de las alteraciones en el sistema inmune encontradas en las pacientes con la enfermedad, en algunas publicaciones se ha hallado una mayor predisposición a la endometriosis en pacientes con trastornos inmunológicos como Lupus eritematoso sistémico (103), incremento de IgG (104), elevación de anticuerpos antiendometriales (105) y en pacientes con enfermedades atópicas (106). Todavía no está aclarado si estos hallazgos predisponen a la enfermedad o son una consecuencia del desarrollo de la misma.

Tóxicos ambientales

Se ha establecido la hipótesis de que ciertos bifenilos policlorinados (Dioxinas), por sus acciones estrogénicas, podrían causar tumores hormonodependientes o enfermedades como la endometriosis. Tras estudios experimentales hay evidencia de que algunas organoclorinas tienen efectos estrogénicos, mientras otras tienen efectos antiestrogénicos. Los estudios más recientes, amplios y mejor diseñados no han comprobado asociación entre exposición y enfermedad, salvo para la endometriosis (107).

En modelos animales, la exposición postnatal a dioxinas o compuestos similares se asoció con espermatogénesis anormal, morfología y

tamaño testiculares anormales y con reducción de la fertilidad y endometriosis en hembras (108).

Cummings (109) trató a varias ratas y ratonas con diversas dosis de Tetraclorodibencenodioxina antes, durante y después de la inducción quirúrgica de endometriosis. Esta sustancia produjo un aumento dramático del tamaño de las lesiones con respecto a los controles. Histológicamente encontró una persistencia del estro en los frotis vaginales de estos animales. En ambas especies se comprobó hepatomegalia y atrofia tímica, indicando disfunción inmune.

Otros autores han indicado que la alteración del sistema inmune que provoca la irradiación con protones, predispone al desarrollo de endometriosis (110). Las radiaciones ionizantes jugarían así un papel en el incremento del riesgo de padecer la enfermedad.

Histopatología

Localización

La endometriosis se ha identificado en prácticamente todos los tejidos a excepción del bazo, que parece gozar de una protección inmunológica especial (111).

La cavidad pélvica es, con mucho, la localización más frecuente de la endometriosis. Con menor asiduidad se puede encontrar en el cérvix, vagina, vulva, glándulas de Skene o pared abdominal. Excepcionalmente se sitúa en tejidos distantes como nódulos linfáticos, tracto gastrointestinal y urinario, pulmones, páncreas, hígado y otros órganos (112).

Redwine (113) realizó un importante estudio sobre la distribución pélvica de la endometriosis. El material de este trabajo lo constituyeron 132 pacientes, entre 16 y 52 años, diagnosticadas por laparoscopia o laparotomía. Empleó un microscopio quirúrgico para conseguir magnificación de la superficie peritoneal, y realizó frecuentes y múltiples biópsias de todas las zonas visualmente sospechosas. Realizó un mapa pélvico, dividiendo dicha región en 16 áreas separadas, que se usaron prospectivamente en todas las pacientes. La distribución de la frecuencia de endometriosis que encontró en cada una de las áreas, en orden decreciente, se aprecia en la tabla 1. En ella comprobamos que las localizaciones más frecuentes fueron el fondo de saco de Douglas, los ligamentos uterosacros y los ligamentos anchos (113).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 1. Distribución pélvica de la endometriosis.

Lugar	Porcentaje
Fondo de saco de Douglas	61.4
Ligamento ancho derecho	38.6
Ligamento uterosacro derecho	37.9
Ligamento uterosacro izquierdo	35.6
Ligamento ancho izquierdo	32.6
Vejiga	19.7
Ovario izquierdo	14.4
Ovario derecho	13.6
Cólon sigmoide	12.1
Fondo uterino	11.3
Trompa izquierda	4.5
Ligamento redondo izquierdo	3.0
Trompa derecha	2.3
Pared abdominal derecha	1.5
Ligamento redondo derecho	0.0
Pared abdominal izquierda	0.0

Redwine DB. Fertil Steril 1987; 47.

Aspecto macroscópico

En cualquier localización, dependiendo de la duración y profundidad de las lesiones, éstas pueden presentarse como nódulos, quistes o placas, con diferentes tonalidades cromáticas y fibrosis periférica (114).

Dentro de la cavidad pélvica, desde el punto de vista de su aspecto visual se han descrito, al menos, cuatro tipos distintos. Las formas denominadas "microscópicas", en las que el peritoneo mantiene inalterada su anatomía macroscópica y únicamente la microscopía permite el diagnóstico (115, 116). Esta modalidad no es admitida por todos los autores (117). Las lesiones superficiales denominadas "atípicas, sutiles o no pigmentadas", que se manifiestan como zonas blancas, rojas, polipoideas o defectos peritoneales saculares (118). Las formas típicas en "quemadura de pólvora", oscuras, y que infiltran pocos milímetros. La endometriosis profunda, nodular, que infiltra más allá de los cinco milímetros, ocasionando nódulos subperitoneales o endometriomas ováricos (119).

Recientemente se aplicó una tecnología avanzada de computerización estereográfica y estereométrica, para la investigación de la arquitectura tridimensional de la endometriosis pélvica (120). Se identificaron dos tipos diferentes de implantes, dependiendo de la presencia o ausencia de ramificaciones. El aparente aspecto multifocal de algunas lesiones en el estudio bidimensional, no fue confirmado en el modo tridimensional. Todas las glándulas estaban interconectadas por estructuras lumbinales en cada lesión peritoneal.

Los endometriomas ováricos son formaciones quísticas, de tamaño y coloración variables, resultado de la acumulación de material residual de hemorragias repetidas. Se presentan en ambos ovarios de forma concomitante en el 40% de los casos, y suelen estar adheridos a los órganos vecinos. Su pared es gruesa y su contenido es un material semifluido de aspecto, generalmente, "achocolatado" (121).

Características microscópicas

La morfología de las lesiones depende de la duración del proceso y en menor medida de la fase del ciclo menstrual de la enferma. Presentan cinco componentes principales: Epitelio endometrial, estroma, tejido fibroso, zonas hemorrágicas y músculo liso ocasional.

Generalmente se identifican glándulas y estroma endometriales, aunque en implantes antiguos sólo se identifica estroma y depósitos de pigmento hemosiderínico. Durante la menstruación se producen hemorragias estromales. Junto a la hemorragia aparecen abundantes histiocitos cargados de hemosiderina y hemofucsina. Estos pigmentos, de color pardo oscuro, transforman a los histiocitos en células pseudoxantomatosas. A veces, en lesiones evolucionadas, se forman nódulos pseudoxantomatosos, en los que únicamente se pueden identificar una zona necrótica central con células espumosas periféricas (114).

En el epitelio ectópico puede observarse actividad secretora por la aparición de vacuolas subnucleares y secreciones intraluminales. Pero dicha condición no es uniforme en todo el epitelio (122). También se ha descrito la presencia de hiperplasia epitelial, secundaria a un hiperestronismo de origen endógeno o exógeno (123).

Eventualmente, los focos de endometriosis pueden presentar una metaplasia ciliada (endotubárica), mucinosa (endocervical), escamosa e incluso mixoide u ósea (114).

Si las lesiones se encuentran en regresión, suelen desaparecer en primer lugar los elementos epiteliales, persistiendo los estromales. Por último, estos últimos se hacen también ausentes, siendo únicamente identificables fibras de colágeno y depósitos de hemosiderina (122).

Cuando el endometrio eutópico y el ectópico se caracterizaron por

inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales sobre componentes citoesqueléticos y mucinas epiteliales, no se encontraron diferencias histoquímicas entre ambos tejidos (124).

La proliferación de fibroblastos en los focos endometriósicos es provocada por la irritación química y mecánica de los tejidos. Los tipos de colágeno I, III y IV, presentes en el endometrio eutópico, se encuentran de igual modo en el ectópico. El tipo predominante de colágeno del tejido conjuntivo fibroso que rodea a los implantes endometriósicos profundos es el tipo I (125).

Receptores hormonales

En 1984 Bergquist realizó un estudio comparativo sobre el aspecto histológico de endometrio y tejido endometriósico, obtenidos simultáneamente (126). Encontró que en el 82% de los casos, el tejido endometriósico desarrolló un patrón típico del ciclo hormonal, mientras en el 18% restante, no hubo un patrón definido. En los casos en que se identificó un patrón típico, dicho patrón fue sincrónico con el endometrio en el 70% de las pacientes, y estuvo fuera de fase en el 30% restante.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales específicos de receptores de estrógenos y de progesterona, Lessey y cols. (127) compararon la presencia de dichos receptores en endometrio y tejido endometriósico. En el endometrio, los receptores de estrógenos fueron más abundantes en la fase proliferativa, tanto en glándulas como en estroma. En la fase secretora, dichos receptores de estrógenos disminuyeron en todos los tipos celulares ($p < 0.005$). Los receptores de progesterona también fueron más frecuentes en la fase proliferativa. En la fase secretora, los receptores de progesterona disminuyeron sólo en las células glandulares, no sufriendo cambios en el estroma. En contraste el contenido de receptores de los implantes endometriósicos fue más heterogéneo y no presentó cambios pronosticables en

relación al momento del ciclo.

Melega y cols. (64) encontraron receptores de estrógenos y de progesterona en el 100 % de los especímenes endometriales, frente al 71 % y 29 % de los implantes endometriósicos respectivamente.

Todo parecería indicar que las diferencias morfológicas entre endometrio y tejido endometriósico fuesen debidas al diferente contenido de receptores esteroideos de ambas muestras. Sin embargo Metzger, basándose en sus hallazgos, estableció un interesante punto de vista especulativo (128). Al datar implantes endometriósicos, sólo el 13 % eran sincrónicos con el endometrio. Los implantes sincrónicos tenían más estroma que los que estaban fuera de fase; y la cantidad de fibrosis se correlacionaba inversamente con la respuesta hormonal. Cuando cuidadosamente midió receptores de estrógenos y de progesterona en endometrio eutópico y ectópico, no encontró diferencias en mujeres con ciclo conservado o en las sujetas a terapia hormonal. Si la cantidad de receptores hormonales era similar y la respuesta tisular distinta, la alteración debería ocurrir distalmente a la unión de las hormonas con sus receptores. Mientras la regulación de la síntesis de receptores hormonales parece ser efecto directo de estrógenos y progesterona, los efectos proliferativos y secretores parecen ser, al menos en parte, un efecto indirecto mediado por estas hormonas a través de factores de crecimiento y otras sustancias paracrinas.

Malignización

La endometriosis es una enfermedad benigna con algunas propiedades de las enfermedades malignas. Mediante anticuerpos anticolágena tipo IV, específica de la membrana basal, se ha demostrado que todas las lesiones endometriósicas presentan una membrana basal continua que las rodea y que se encuentra intacta (129). Si embargo, en el 3.6% de los casos hay atipia epitelial severa, que puede tener un origen reactivo o exhibir un auténtico potencial

maligno (130).

No se conoce la incidencia exacta de carcinomas relacionados con endometriosis pélvica, vaginal, colorectal o urinaria. En el ovario, 0.3-0.8% de las endometriosis se asocian a carcinomas (114). Por contra, 11-28% de las pacientes con carcinoma endometrial de ovario tienen endometriosis (130).

El 70% de los tumores relacionados con endometriosis ovárica y el 90% de los relacionados con endometriosis extraovárica son carcinomas endometrioides (131). Llama la atención la alta frecuencia con la que el carcinoma de células claras se asocia a endometriosis (14%) (132).

También se han descrito sarcomas derivados del estroma endometrial (133).

Fluido peritoneal

Gran parte de las investigaciones sobre endometriosis, en los últimos años, se han realizado sobre el líquido peritoneal. Su papel en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad se considera cada vez más importante. Se supone que no existe en el fluido peritoneal un factor único inductor de la endometriosis; pero, algunas de las alteraciones locales presentes en él, podrían ser las que impedirían la remoción inmunológica de células endometriales y permitirían el progreso de los implantes.

El líquido peritoneal de pacientes con endometriosis presenta importantes diferencias con el de pacientes sin la enfermedad. Muchas de estas diferencias pueden ser consecuencia del proceso, pero alguna pudiera ser causa del mismo. Queda por delante un gran camino para delimitar lo que es causa y lo que es consecuencia. Con posterioridad expondré ampliamente estos aspectos. Baste ahora mencionar que alguna de estas características particulares del fluido

peritoneal se ha propuesto como método diagnóstico de la enfermedad.

La evaluación citológica del líquido peritoneal aspirado del fondo de saco de Douglas puede revelar la presencia de células endometriales y macrófagos con hemosiderina (134). Su estudio bioquímico e inmunológico mostraría la presencia de prostaglandinas, factores del complemento, una pléyade de células del sistema inmunológico, linfocinas, monocinas, factores de crecimiento y antígenos de superficie, en proporciones distintas a las encontradas en el fluido peritoneal de las mujeres sin endometriosis (122).

Clínica y fisiopatología

Síntomas

Los síntomas no son específicos, ni están siempre presentes, ni la severidad de ellos se relaciona con la extensión y severidad del proceso (5).

En algún lugar se la ha definido como "la gran simuladora" por su capacidad de remedar diferentes procesos clínicos. En realidad, existen muchos casos de endometriosis que son asintomáticos y su diagnóstico se hace de forma casual en el trascurso de intervenciones realizadas por otra indicación. A veces se presenta como un cuadro de abdomen agudo, por rotura de un endometrioma, y en otras ocasiones adopta el aspecto de un proceso pseudotumoral (135).

La variedad de los síntomas depende de la localización de las lesiones, mientras que su intensidad depende, fundamentalmente, de la actividad y profundidad de los focos de endometriosis.

En un intento de describir ordenadamente la semiología de la

enfermedad, se han clasificado los síntomas en dos apartados:

- Síntomas habituales de la endometriosis pélvica.
- Síntomas menos frecuentes, dependientes de localizaciones específicas.

Síntomas habituales de la endometriosis pélvica

Combinaciones de dolor abdominopélvico, hemorragia uterina disfuncional e infertilidad/esterilidad, conforman cuadros que pueden oscilar desde constituir un problema leve, o incluso inadvertido, hasta convertirse en una enfermedad invalidante.

El dolor abdominopélvico puede manifestarse como dismenorrea, dispareunia o dolor pélvico crónico.

La dismenorrea es el síntoma más frecuente. Entre el 50% y 90% de las pacientes la sufren (136, 137). En nuestro medio se ha registrado en el 71.2% (138). Una dismenorrea es sospechosa de endometriosis cuando aparece en forma secundaria después de un intervalo de tiempo relativamente libre de dolor, cuando es progresiva y no se alivia con antiprostaglandínicos o contraceptivos orales; o cuando se refiere a la región ano-rectal, sacra o coccígea. Si bien la dismenorrea primaria no se considera síntoma sospechoso de endometriosis, ya hemos mencionado la controversia suscitada en cuanto a su papel en la génesis de la enfermedad (véase epidemiología).

La dispareunia se presenta en el 30% de las pacientes (137). En nuestro medio ronda el 17% (138). Lo más típico es el dolor a la penetración profunda irradiado al recto. Generalmente es motivado por la afectación del septo recto-vaginal, por la fijación forzada del útero en retroversión, por la fijación adherencial anexial o por la presencia de nódulos endometriósicos en los ligamentos uterosacros o fondo de saco de Douglas (139). Las manifestaciones

álgicas son más intensas en los días premenstruales y se exacerban con determinadas posturas del coito (140).

Se define el dolor pélvico crónico como la molestia pélvica no cíclica que excede de seis meses de duración y que no desaparece con el uso de analgésicos no narcóticos. Supone un problema sanitario de gran trascendencia. Comprende cerca del 10% de las consultas de enfermas extrahospitalarias y a causa de él se practican 20% de las laparoscopias y 12% de las histerectomías en Estados Unidos (141). Los hallazgos laparoscópicos encontrados en mujeres que padecen este síntoma son: Pélvis normal, endometriosis y adherencias pélvicas. Cada una de estas categorías supone el 33% de las pacientes (142). En nuestro medio se presentó en casi el 40% de las pacientes con endometriosis (138).

Existe consenso en la consideración de éstos como síntomas sospechosos de la enfermedad. Sin embargo, ni la fisiopatología del dolor, ni la correlación entre la intensidad del mismo y la severidad de la endometriosis están totalmente aclarados.

En los casos en que existen adherencias, cicatrices, retracciones y fibrosis, la distorsión anatómica que se produce justifica la presencia de dolor crónico. La infiltración profunda o en el seno de estructuras ligamentarias, por su proximidad a paquetes vásculo-nerviosos, pueden provocar una reacción inflamatoria compresiva perineural y desencadenar dolor importante (119, 143). El aumento de presión interna de los endometriomas, que ocurre durante la menstruación, puede estimular las terminaciones nerviosas de la cápsula fibrótica y ocasionar dismenorrea (144). Pero ¿Por qué mecanismo se produce el dolor, a veces muy severo, en mujeres con endometriosis superficiales mínimas o atípicas, que no presentan las características señaladas anteriormente?

Se sabe que prostaglandinas y prostaciclina estimulan receptores del dolor mediante estímulos químicos y mecánicos (145). Badawy demostró una correlación positiva entre la cantidad de prostaglandinas en el líquido peritoneal

y la presencia de dolor en pacientes con endometriosis (146). Tromboxano y prostaciclina también se encontraron más elevados en el fluido peritoneal de las pacientes con endometriosis que presentaban dolor (147). Basándose en estos datos, Vernon (148) hipotetizó sobre la posibilidad de que la intensidad del dolor pudiera deberse a la diferente actividad metabólica de los distintos implantes. Para verificar esta hipótesis, dividió las lesiones endometriósicas en lesiones superficiales petequiales o rojas y lesiones clásicas. Tomó muestras de cada una de ellas y las cultivó *in vitro*, midiendo la actividad metabólica de cada tipo de implante por la producción de prostaglandina F₂alfa. Comprobó que las lesiones petequiales producían más prostaglandina F₂alfa que las clásicas. Concluyó que la síntesis de prostaglandinas y de otros productos puede depender del estado metabólico de los implantes; y eso podría dar una mejor explicación para la aparición de síntomas que la extensión de la enfermedad. Los pacientes con enfermedad extensa y asintomáticos, tendrían implantes inactivos.

Múltiples estudios han intentado encontrar infructuosamente una relación entre severidad de la enfermedad, según las clasificaciones en uso, y dolor. Ello, indudablemente, es debido a que ninguna de estas clasificaciones tiene en cuenta la actividad metabólica de las lesiones (137).

Se han descrito todos los tipos de alteraciones menstruales en la endometriosis. Alguno de estos patrones se consideran causa más que consecuencia de la enfermedad. Ya hemos comentado como la proiomenorrea, polimenorrea e hipermenorrea, fueron características menstruales habituales, durante toda la vida fértil, de las pacientes con endometriosis (93). No obstante, la presencia de "spotting" en los días previos a la menstruación, por su elevada frecuencia, constituye un síntoma sospechoso (149). En nuestro medio, alguna forma de alteración menstrual pudo ser registrado en el 23% de las pacientes (138).

En el origen de estas anomalías se pueden reconocer tres posibilidades. La primera de ellas sería que dichas alteraciones fuesen características menstruales primarias y, por consiguiente, independientes de la

enfermedad. Una segunda posibilidad consistiría en que el cuadro fuese debido a procesos coexistentes, como miomas o adenomiosis, que son patologías estrógenodependientes asociadas con frecuencia a la endometriosis (150). Por último, se ha demostrado la presencia de una gran variedad de disfunciones ovulatorias relacionadas con la enfermedad. Estas disfunciones incluirían anovulación, folículo luteinizado no roto, insuficiencia lútea y cuerpo lúteo persistente por luteolisis inadecuada (151). Cualquiera de ellas podría ocasionar un patrón menstrual anómalo.

Uno de los aspectos más controvertidos de la endometriosis es su relación con la esterilidad e infertilidad. Cuando se efectúa laparoscopia, la frecuencia de endometriosis pélvica en mujeres estériles es significativamente mayor que en mujeres fértiles (152). Para Guzick (153), las mujeres estériles tienen una probabilidad 7-10 veces mayor de tener endometriosis que las fértiles. Esta enfermedad se diagnostica en el 14-60% de las parejas con esterilidad de origen desconocido (154, 155). Por otro lado, mujeres estériles con endometriosis, bajo inseminación artificial de donante, tienen un porcentaje de fecundación por ciclo de 0.02 comparado con el 0.12 de mujeres estériles sin endometriosis (154).

En nuestro medio, la esterilidad se presentó en casi el 30% de las pacientes con endometriosis (138).

Aunque la asociación de endometriosis y esterilidad es indudable, permanece todavía no aclarado si los mecanismos que provocan la disminución de la fertilidad son causa o consecuencia de la endometriosis (156).

Si la enfermedad es extensa con adherencias y retracciones pronunciadas, o si están presentes grandes endometriomas, la infertilidad puede ser claramente atribuida a distorsión anatómica. Pero, estadios precoces se relacionan solamente con una moderada disminución de la fertilidad. Diferentes estudios han demostrado que las pacientes con endometriosis mínima o leve, antes o después suelen quedar embarazadas sin tratamiento específico, por lo que

muchos dudan de la existencia real de esterilidad en estos casos (157, 158). Algunas mujeres con la enfermedad consiguen fácilmente embarazos y, en ellas, el diagnóstico es casual al someterse a esterilización tubárica; o no llega a realizarse nunca.

Ante cualquier discusión sobre los posibles mecanismos de la esterilidad en la endometriosis, se ha de tener en mente que no es infrecuente en estas parejas la existencia de factores adicionales, como factor masculino, factor cervical o factor tubárico infeccioso (159).

Establecidas las consideraciones previas, veremos a continuación los mecanismos propuestos para explicar la esterilidad e infertilidad en los casos en los que no existe distorsión anatómica.

DISFUNCIONES OVULATORIAS. Anovulación (160), folículo luteinizado y no roto (161), insuficiencia lútea (162-166), cuerpos lúteos persistentes por fallo en la luteolisis (167). Estas alteraciones podrían deberse a secreción anormal de gonadotropinas, anomalías en el crecimiento folicular, alteración en la formación de receptores de LH en la granulosa, hiperprolactinemia o alteración en el contenido de prostaglandinas en el líquido peritoneal.

ALTERACIONES INMUNOLOGICAS. Reacciones autoinmunes a proteínas refluidas tras la menstruación, con depósitos de IgG y C3 en el endometrio. Aumento sistémico de anticuerpos antifosfolípidos y antihistonas. Todo ello originaría interferencia con el paso de espermios, imposibilidad de implantación del blastocisto y ausencia de desarrollo embrionario (168-171).

FACTOR PERITONEAL. Aumento de macrófagos activados que, directamente o a través de sustancias secretadas por ellos, destruirían, inmovilizarían o impedirían la interacción de espermios, oocitos y/o embriones (172-177). El aumento de prostaglandinas alteraría la motilidad tubárica y la captación y transporte ovular. También se ha sugerido la existencia de un factor

inhibidor de la captura del oocito (178) y de un factor inhibidor del desarrollo embrionario (179). Interleukina-1 presente en el líquido peritoneal es un tóxico para el desarrollo embrionario (180, 181, 182). Otras citocinas, linfotoxinas y factores proteicos solubles derivados de células inmunes, epiteliales o estromales, tendrían, de igual modo, capacidad aniquiladora de gametos y embriones (183-190). No obstante, el efecto deletéreo del fluido peritoneal de pacientes con endometriosis sobre la supervivencia y desenvolvimiento de los gametos no ha podido ser comprobado por todos los autores (191).

INCREMENTO DE ABORTOS. Aunque varios trabajos encuentran una tasa incrementada de abortos en pacientes no tratadas (192, 193), otros niegan dicha asociación (156).

Muy recientemente, un grupo de investigadores de nuestro entorno (194) ha planteado una nueva hipótesis en relación con la pérdida embrionaria en pacientes con endometriosis. En un programa de Fertilización *in vitro* compararon el desarrollo embrionario precoz de pacientes con endometriosis y de pacientes con esterilidad tubárica no debida a endometriosis. No encontraron diferencias en el número de blastómeras entre ambos grupos en el segundo día tras la inseminación. Sin embargo, al tercer día hubo un menor número de blastómeras y un incremento del número de embriones con crecimiento detenido en el grupo de pacientes con endometriosis ($p < 0.05$). Descartaron que esas diferencias hubieran podido ser debidas a la distinta calidad del semen. Con esos hallazgos, elaboraron la siguiente hipótesis: La activación del genoma embrionario humano ocurre entre las fases de 4 y 8 células (día 3). Podríamos pues encontrar embriones que se desarrollan normalmente bajo los órdenes del genoma materno, pero que tienen una "alteración" en la activación de su propio DNA y, por tanto, quedan detenidos. A la espera de nuevos trabajos que profundicen en este aspecto, recomiendan retrasar la transferencia embrionaria en programas de fertilización *in vitro* de pacientes con endometriosis, para no transferir embriones que se van a bloquear.

En algunas mujeres con endometriosis se ha citado la presencia de

galactorrea. Ya se ha mencionado la existencia ocasional de hiperprolactinemia y en varios trabajos (162, 195) se han observado respuestas de prolactina a la TRH significativamente más altas en pacientes con la enfermedad, comparadas con controles.

Dos investigaciones previas indicaron que la masa ósea en la endometriosis, debido a la distinta composición, estaba disminuida a nivel periférico, mientras no cambiaba a nivel axial (196, 197). Un estudio posterior, utilizando densitometría de cuerpo entero (DEXA), concluyó que, en todas las localizaciones, la masa ósea era igual en pacientes con endometriosis o sin ella (198).

Aunque un aumento de la cantidad de líquido peritoneal es la norma en estas pacientes (199), un síntoma de extraña fisiopatología es la distensión abdominal debida a ascitis masiva. Esta ha sido descrita por varios investigadores (200, 201), principalmente en mujeres jóvenes, nulíparas y de raza negra. Su desaparición fue constante tras tratamiento médico.

Síntomas dependientes de localizaciones específicas

Las localizaciones atípicas de los focos endometriósicos pueden dar lugar a una miriada de síntomas, cuya característica común suele ser su aparición esporádica; coincidiendo generalmente con la fase menstrual. Dentro de la excepcionalidad de su presentación, algunos de los más frecuentes son los siguientes:

Manifestaciones respiratorias: Dolor torácico, disnea o hemoptisis catameniales. Son debidas a focos pleuropulmonares que originarían neumotórax o hemotórax cíclicos (202, 203).

Manifestaciones urinarias: Disuria, polaquiuria y hematuria

periódicas por lesiones vesicales. Muy raramente ureterohidronefrosis por obstrucción ureteral (135).

Manifestaciones digestivas: Rectorragias y cuadros pseudoobstructivos por afectación intestinal. Crisis apendiculares o similares a diverticulitis.

Manifestaciones cutáneas: Cicatrices tumefactas y dolorosas durante el periodo menstrual, localizadas en perineo, vagina, ingle, ombligo etc...

Manifestaciones neurológicas: Focos cerebrospinales que originan cefaleas y manifestaciones sensitivas y/o motoras, por defecto o por exceso (204). Síndromes ciatálgicos catameniales a causa de nódulos endometriósicos retroperitoneales (205).

Hallazgos exploratorios

La simple inspección permitiría establecer la sospecha diagnóstica, en aquellos casos en que por su localización son fácilmente visibles (Cicatrices cutáneas, genitales externos, vagina, cérvix, etc.), al observar focos nodulares de color negro-azulado típicos.

Se ha señalado la presencia, no constante, de algunos signos, apreciados al efectuar una exploración bimanual vaginal o rectovaginal combinada:

Dolor pélvico, generalizado o localizado, despertado por las maniobras exploratorias.

Dolor a la palpación del fondo de saco de Douglas o de los ligamentos uterosacros.

Retroversión fija uterina, con vivo dolor al intentar su reposición.

Palpación de nodulaciones, de tamaño y localización variables (fondo de saco de Douglas, ligamentos uterosacros, tabique rectovaginal), que aumentan su volumen y sensibilidad con la menstruación, disminuyendo en el intermenstruo (Signo de Halban).

Tumoraciones anexiales con movilidad muy reducida debido a sus adherencias con la cara posterior del ligamento ancho y órganos vecinos.

La presencia de tumor anexial, retroversión adherente uterina e induración nodular del Douglas se conoce en los textos clásicos como "complejo de Sampson" (206).

Diagnóstico

En una proporción variable, pero no desdeñable, el diagnóstico de la endometriosis es casual en el transcurso de una laparotomía o laparoscopia realizadas por otra indicación. A veces, el informe del estudio histopatológico de tejidos extirpados destaca la existencia de la enfermedad, incluso inadvertida en el acto quirúrgico.

En ausencia de una clínica y exploración patognomónicas, el diagnóstico clínico de la endometriosis sólo puede ser de sospecha o presunción, con mayor o menor grado de probabilidad dependiendo del mayor o menor acúmulo de síntomas, hallazgos exploratorios y datos epidemiológicos a su favor (135).

Anteriormente señalé que combinaciones de dolor abdominopélvico, hemorragia uterina disfuncional e infertilidad/esterilidad conformaban el cuadro

típico de la enfermedad. Sentada la sospecha clínica, se dispone en la actualidad de un nutrido elenco de pruebas complementarias de utilidad relativa, hasta llegar a la laparoscopia y biopsia que aportan la certeza diagnóstica.

De menor a mayor complejidad y penetración del medio interno, disponemos de: Estudio de la temperatura basal, determinación de marcadores bioquímicos e inmunológicos, pruebas radiológicas de diagnóstico por la imagen, sistemas de puntuación de los hallazgos previos combinados y laparoscopia.

Temperatura basal

En el año 1985, Swolin comunicó una curiosa observación (207). Él, en la mayoría de las pacientes con endometriosis confirmada, apreció un descenso tardío de la curva de temperatura basal después de un ascenso normal durante la fase lútea. Aconsejó utilizar este dato, barato y poco complicado, como signo diagnóstico de endometriosis pélvica.

Posteriormente este hallazgo ha sido confirmado por otros estudios llevados a cabo sobre población de áreas geográficas muy alejadas (continentes distintos) (208, 209).

Lo más probable es que sea debido a la persistencia del cuerpo lúteo por fallo de los mecanismos implicados en la luteolisis. De ser así, su presencia no sería tan constante como señaló Swolin. De cualquier modo, su constatación puede ser de ayuda en los casos de enfermedad mínima, donde otros medios diagnósticos, empleados antes de la laparoscopia, pueden fallar.

Hoy se conoce a este hallazgo como "Signo de Göteborg" (210).

Marcadores bioquímicos e inmunológicos

El CA 125 representa un determinante antigénico de una glucoproteína de unos 200.000 Kilodaltons. Se cuantifica utilizando el anticuerpo monoclonal OC 125. El número representa el intento 125º por un grupo de estudio para producir un anticuerpo monoclonal de un cáncer ovárico epitelial.

Los valores de CA 125 se encuentran incrementados en casi el 80% de los cánceres ováricos no mucinosos, pero también en casi el 60% de los carcinomas pancreáticos y en el 20-25% de todos los demás tumores sólidos estudiados. Se encuentra elevado, de igual modo, en muchos trastornos ginecológicos y no ginecológicos benignos. Entre ellos destacan endometriosis, adenomiosis, leiomiomas, enfermedad inflamatoria pélvica, diverticulitis y otros procesos inflamatorios intestinales, cirrosis hepática y en la primera mitad de la gestación (211).

Se considera 35 unidades/ml. una cifra límite normal de CA 125. En general se admite que valores superiores a 200 unidades/ml. se correlacionan con patología tumoral más frecuentemente, y valores entre 35 y 200 unidades/ml son corrientemente asociadas a enfermedades benignas. No obstante, la literatura está llena de casos que suponen una excepción a esta regla. Kamerer Doak (212) comunicó el caso de una mujer de 37 años con dismenorrea severa y un CA 125 de 1036 unidades/ml. Como hallazgos en la laparotomía exploradora se encontraron una adenomiosis quística y una endometriosis en la serosa uterina. Tras la excisión de estas áreas el CA 125 retornó a valores normales.

El origen del aumento de la expresión de este antígeno en las células derivadas del epitelio celómico embrionario de las mujeres con endometriosis es incierto. Barbieri postula dos mecanismos (213): 1. Aumento de la expresión de CA 125 en la superficie celular de los depósitos endometriósicos. 2. Mecanismo inflamatorio (téngase en cuenta que este mecanismo está demostrado, ya que CA 125 aumenta en presencia de enfermedad inflamatoria pélvica).

En un intento de obtener el mayor beneficio diagnóstico, se ha determinado este antígeno en plasma, fluido peritoneal y contenido de endometriomas. También se ha determinado su correlación con la gravedad de la enfermedad, con la respuesta al tratamiento y su verdadero valor para el diagnóstico propiamente dicho.

En el diagnóstico de la enfermedad, el CA 125 tiene un valor relativo. Aunque presenta especificidad alta, la sensibilidad encontrada por diversos autores es pobre. Poniendo como límite 16 unidades/ml., Pittaway encontró sensibilidad de 53% y especificidad de 93% (214), Wild apreció sensibilidad de 27.3% y especificidad de 82.6% (215), Koninckx observó sensibilidad de 25% y especificidad de 87% (216).

La mayoría de los trabajos coinciden al reconocer que la verdadera utilidad del CA 125 reside en su capacidad, como método de seguimiento, para monitorizar la respuesta al tratamiento (217, 218). Sin embargo, otros estudios encuentran que hay una correlación entre los niveles estrogénicos y los de CA 125, de forma que este último descendería en respuesta al tratamiento de forma paralela al nivel estrogénico. Al cesar el tratamiento, y también paralelamente a los estrógenos, el marcador sufriría un rápido incremento. Estos hallazgos cuestionan de forma importante la utilidad del CA 125 en el seguimiento de los pacientes tratados (219, 220, 221).

Koninckx (216), encontró mayor correlación entre los niveles plasmáticos de CA 125 y endometriosis profunda o endometriomas que con endometriosis superficial. En su opinión la endometriosis pélvica superficial secreta CA 125 principalmente a través del fluido peritoneal, mientras que los endometriomas y la endometriosis profunda lo hacen a través del plasma. Por otro lado, varios trabajos (220, 221) señalan una ausencia de correlación entre la extensión de la enfermedad, determinada por la clasificación de la Sociedad Americana de Fertilidad, y los niveles plasmáticos de CA 125. Únicamente el grado adherencial correlacionaría de forma positiva con dicho antígeno. Estos hallazgos estarían a favor del origen inflamatorio del CA 125.

El diagnóstico diferencial de los endometriomas con quistes antiguos del cuerpo lúteo, basándose únicamente en su aspecto visual, es muy difícil. De 95 "quistes de chocolate" con diagnóstico macroscópico de endometrioma, se confirmó por histología de la pieza el diagnóstico en el 68% de los casos. El resto fueron quistes de cuerpo lúteo (32%). En este mismo trabajo, obteniendo líquido de los quistes antes de ser extirpados, se confirmó que en todos los casos de endometrioma el CA 125 era mayor de 10.000 unidades/ml, mientras que si se trataba de cuerpos lúteos el CA 125 era menor de 1000 unidades/ml. Por lo tanto, el desarrollo de un Kit instantáneo para la determinación semicuantitativa de CA 125 permitiría el diagnóstico intraoperatorio, evitando extirpaciones innecesarias de cuerpos lúteos en que se había sospechado endometrioma (222).

En relación con el CA 125, hemos de señalar en último lugar que ha sido sistemáticamente observado, y ya unánimemente aceptado, que sus niveles aumentan en los periodos lúteo tardío, menstrual y folicular precoz en las pacientes con endometriosis (216, 220, 223).

Muy recientemente se ha evaluado un nuevo radioinmunoensayo para la detección sérica de CA 125 (CA 125 II) (224). Las primeras observaciones demostraron la superioridad de esta técnica frente al radioinmunoensayo clásico. Se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CA 125 de pacientes con y sin endometriosis empleando ambas técnicas. No obstante, la aplicabilidad del nuevo ensayo CA 125 II en pacientes con endometriosis debe de ser más investigada.

Otras sustancias se han relacionado con la presencia de la enfermedad. De entre ellas, la Proteína placentaria 14 merece una consideración especial. En un importante estudio Koninckx determinó la proteína placentaria 14 en plasma y líquido peritoneal de 384 mujeres que se sometieron a laparoscopia por dolor pélvico o infertilidad. Encontró que los niveles de proteína placentaria 14 fueron entre 10 y 100 veces mayores en líquido peritoneal que en plasma. Sus niveles se correlacionaron con el área de las lesiones endometriósicas superficiales y con el volumen y profundidad de infiltración de endometriomas

y nódulos profundos, respectivamente (216). Su valor para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad permanece no aclarado. Ulteriores estudios deben confirmar las expectativas que esta sustancia ha creado.

Desde comienzos de la década de los 80, se apreciaron niveles circulantes más altos de autoanticuerpos en mujeres con endometriosis, tanto contra constituyentes celulares como contra tejidos específicos (225). Particularmente los mejor y más ampliamente estudiados han sido los anticuerpos antiendometriales (226). La mayoría de los trabajos refieren niveles significativamente elevados de anticuerpos antiendometriales en el suero de mujeres endometriósicas respecto a los grupos control (105, 225, 227, 228, 229-233). Solamente un estudio niega la relación entre endometriosis y autoinmunidad endometrial (234). Dicho artículo fue duramente criticado por Mathur y Chihal (235). Estas dos autoras, que reconocieron haber enseñado a Switchenko las técnicas de hemaglutinación y western-blot usadas en su trabajo, pusieron en duda la metodología que él empleó.

Se han aportado los valores predictivos de este marcador inmunológico. Chihal encuentra una sensibilidad de 74% y especificidad de 100% (105). Wild señala una sensibilidad de 83.1% y especificidad de 78.8% (215).

Pese a la coincidencia en los resultados de la mayoría de los trabajos, lo cierto es que entre ellos existió una gran variabilidad metodológica. En cuanto al endometrio al que se ligaba el suero, se ha empleado endometrio de los propios pacientes, endometrio normal de otras mujeres, o líneas celulares de cáncer de endometrio. Los métodos de detección de estos autoanticuerpos también han sido diferentes; inmunofluorescencia, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, hemaglutinación, western-blot y ELISA. Finalmente, los grupos de control empleados abarcaron mujeres en las que no se había investigado la presencia de endometriosis, mujeres con laparoscopia negativa para la enfermedad y hombres.

Después de lo señalado, parecería adecuado uniformizar los estudios futuros referidos a este aspecto que promete un porvenir brillante. Las recomendaciones de las más destacadas autoridades invitan a incorporar la determinación de anticuerpos antiendometriales a la rutina diagnóstica de la endometriosis (236, 237).

Pruebas radiológicas de diagnóstico por la imagen

Fundamentalmente nos referiremos en este apartado a la ultrasonografía. Otras técnicas de diagnóstico radiológico, como Tomografía axial computadorizada o Resonancia nuclear magnética, pueden mostrar imágenes compatibles con nódulos endometriósicos profundos o endometriomas. Sin embargo, la especificidad de estas imágenes es menor que las que presentan los ultrasonidos. La relación coste/beneficio resulta pues desfavorable para estas técnicas más sofisticadas y más caras (238, 239).

Mediante ecografía son imperceptibles los implantes superficiales y las adherencias (240). La imagen patognomónica está formada por un quiste, en general perfectamente delimitado por una fina cápsula muy refringente, cuyo interior es ecogris, suave y homogéneo (241).

Cuando se utiliza una sonda transabdominal sólo se pueden identificar con alta sensibilidad formaciones quísticas mayores de 5 cm, y aún entonces, dicha sensibilidad se sitúa entorno al 65% (242). Con endosondas vaginales se consiguen imágenes típicas con tamaños de 0.5-1 cm, siendo, de este modo, muy superior la sensibilidad de la técnica para el diagnóstico de la enfermedad.

Si se añade la señal Doppler color a la endosonografía vaginal se podrá apreciar un dato adicional, cual es ausencia de vascularización en el interior de los focos endometriósicos. La vascularización es periférica y con

elevados índices de resistencia. Contrariamente, el cistoadenocarcinoma endometriode presenta angiogénesis y neovascularización intratumoral, con shunts abundantes y bajos índices fluxométricos (243).

Recientemente, algunos investigadores han dispuesto de una nueva tecnología sonográfica que permite la integración de las imágenes bidimensionales computadas para formar imágenes tridimensionales (241). Es pronto para juzgar el lugar que ocupará dicha técnica en el futuro, pero se podría pensar que determinados aspectos arquitecturales y de relación con estructuras vecinas serían mejor apreciados con ella. Al hablar de la histopatología macroscópica de la enfermedad, ya señalamos cómo Donnez y cols. consiguieron, mediante tratamiento informático de imágenes bidimensionales microscópicas, la tridimensión.

Sistemas de puntuación combinados

En un intento de encontrar sistemas diagnósticos incruentos, varios autores han diseñado sistemas de puntuación de hallazgos clínicos, analíticos o radiológicos. Los resultados obtenidos con estos métodos han sido dispares, siendo poco utilizados en la clínica diaria.

Masuzaki puntuó ocho hallazgos específicos de la siguiente manera: Dismenorrea (1 punto), dispareunia (3 puntos), retroversión uterina (3 puntos), Douglas nodular (3 puntos), útero blando (1 punto), irregularidad marginal del útero (1 punto), histerosalpingografía con adherencias perifimbricas (2 puntos), esterilidad inexplicada (2 puntos). Realizando posteriormente laparoscopia, comprobó que la probabilidad de tener endometriosis fue del 10% con puntuaciones entre 0-4, del 60% con puntuaciones entre 5-8, y del 90% con puntuaciones entre 9-16 (244).

Posteriormente Matsuura diseñó, en pacientes infértiles, una

puntuación con once ítems que sirviera como método de screening para endometriosis. Con los valores de corte establecidos, señaló una sensibilidad de 91.2%, especificidad de 94.5%, valor predictivo positivo de 94.5% y valor predictivo negativo de 66.7% (245).

En los últimos años se han descrito algunos sistemas de puntuación que involucran a parámetros bioquímicos, como CA 125, e inmunológicos, como inmunoglobulinas, autoanticuerpos y factores del Complemento (246).

Todos estos sistemas diagnósticos mediante scoring, independientemente de su mayor o menor eficacia, presentan un defecto importante, como es la falta de cuantificación del grado de extensión de la enfermedad.

Laparoscopia

La laparoscopia ha proporcionado a la endometriosis la posibilidad de un diagnóstico precoz y preciso. La mayoría de los autores la defienden como obligada en toda sospecha de endometriosis (247-252). Proporciona en este campo diversas ventajas sobre todos y cada uno de los métodos diagnósticos mencionados (253):

1. Facilita un diagnóstico preciso de la enfermedad mediante la visualización del aspecto de las lesiones típicas, la biopsia de las lesiones atípicas o sospechosas, la citología de raspado peritoneal, o la obtención de líquido peritoneal para estudio citológico, bioquímico o inmunológico.

2. Permite valorar la extensión y, por tanto, realizar el estadiaje de la enfermedad.

3. Facilita el diagnóstico diferencial con otras masas anexiales.

4. Posibilita actitudes terapéuticas simultáneas, no posibles con otras técnicas exclusivamente diagnósticas.
5. Facilita una completa evaluación si la paciente es estéril.
6. Reconoce la eficacia de los diversos tratamientos al realizarse como segunda observación.

Durante más de 50 años la endometriosis se diagnosticó reconociendo macroscópicamente sus dos típicas manifestaciones: los focos, placas o nódulos y los endometriomas, asociados a adherencias (250). Pero en los últimos años la experiencia de varios autores ha demostrado que la enfermedad puede manifestarse con otras lesiones peritoneales, las que han sido llamadas sutiles, atípicas o no pigmentadas por su aspecto diferente a las clásicas (116, 118, 254). Estos últimos autores han sistematizado detalladamente las distintas formas sutiles o atípicas en que se puede manifestar la enfermedad. Los veinte tipos diferentes de lesiones que describen incluyen lesiones fibróticas blancas, marrones o negras, lesiones vesiculares claras, blancas, marrones o negras, lesiones rojas planas, salientes o polipoideas, parches amarillo-pardos, lesiones amarillas, bolsillos peritoneales y adherencias (116).

Cuando el diagnóstico laparoscópico se basa sólo en el reconocimiento de las imágenes clásicas, queda entre un 10 a un 15% de pacientes portadoras de la enfermedad sin diagnosticar y se subestima la extensión de la enfermedad en un 50% (116, 118, 255).

Todo esto ha movido a algunos investigadores a pensar, como ya se comentó al hablar del aspecto macroscópico de la endometriosis, que la enfermedad microscópica de Murphy no existe, y que todas las formas de la enfermedad tienen una alteración visual del peritoneo que hay que aprender a descubrir (249). Para un mejor conocimiento de estas lesiones, se han sugerido varios métodos. La realización de la laparoscopia en la fase premenstrual favorece la percepción de lesiones sutiles (mayor vascularización y estímulo

hormonal) (247). El bañado de áreas extensas con el líquido peritoneal sanguinolento permite una mejor identificación de focos sutiles (256). La utilización del microcolpohisterioscopio de Hamou con menos de 20 aumentos, o el acercamiento de la lente del laparoscopio a una localización muy próxima a la superficie peritoneal magnifican los detalles no apreciables de otro modo (250). La escuela de Clermont-Ferrand diseñó la idea de cubrir toda la pélvis con azul de metileno a gran concentración. Este es tomado especialmente por aquellas zonas de peritoneo enfermas, sin que visualmente exista evidencia de que se trate de endometriosis previamente a su aplicación (45). Otra alternativa, cuando no se observan lesiones específicas, es valorar el líquido peritoneal, pues se ha descrito que en mujeres con endometriosis produce burbujas jabonosas al contactar con los líquidos habituales que empleamos para realizar la cirugía (257). En los últimos años se está ensayando la aplicación de sustancias fotosensibles que sean captadas y retenidas por los implantes y puedan ser expuestas durante la laparoscopia a una luz de cierta longitud de onda que desencadene quimioluminiscencia (258).

Las biopsias realizadas en el curso de la laparoscopia permiten no sólo el diagnóstico de lesiones no pigmentadas, sino también el diagnóstico diferencial entre endometriomas y quistes antigüos del cuerpo lúteo (259).

En los últimos años se ha comprobado el valor de la citología para el diagnóstico de la endometriosis. Giménez (260) estudió la capacidad diagnóstica de la citología, tras punción-aspiración con aguja fina de quistes ováricos, encontrando un porcentaje del 20% de extendidos no valorables y una correlación cito-histológica del 100% en los extendidos valorables. Bühler (261) examinó extendidos citológicos, tomados por raspado, de alteraciones peritoneales comprobadas por laparoscopia. Tomó simultáneamente biopsia de las mismas alteraciones, y recogió líquido peritoneal para citología. La concordancia cito-histológica en el diagnóstico de endometriosis fue del 74%, con una sensibilidad del 80% y un valor predictivo positivo del 85%. La citología del líquido peritoneal aportó datos positivos en el 33% de los positivos en histología.

Clasificación

Hasta el año 1973, la literatura médica contenía numerosos trabajos relacionados con la eficacia de la cirugía y la mejora de las tasas de embarazo en pacientes con endometriosis. Sin embargo, los resultados eran muy difíciles de interpretar, pues ninguno de ellos correlacionaba las tasas de embarazo con la severidad o extensión de la enfermedad.

A pesar de la ausencia de utilización rutinaria de sistemas de clasificación antes de 1973, los intentos por establecer una categorización de la enfermedad no fueron pocos. En 1949, Wicks y Larson propusieron la primera clasificación histológica de la enfermedad. Huffman dos años más tarde, propuso la primera clasificación quirúrgica, ordenando la endometriosis en cuatro estadios (Tabla 2) (253). Beecham presentó en 1966 una clasificación simplificada, basada fundamentalmente en los hallazgos exploratorios (262). No correlacionó la severidad de la enfermedad con el logro de un embarazo (Tabla 3).

En el año 1973, un grupo de investigadores del Baylor College of Medicine, en Houston, Tejas, encabezados por Acosta (263), diseñaron una clasificación en base a un estudio retrospectivo de 107 pacientes con endometriosis, definiendo diferentes estadios y correlacionándolos con las tasas de embarazo conseguidas tras tratamiento. El tamaño y distribución de las lesiones, la presencia de adherencias y cicatrices, así como la influencia de los órganos vecinos fueron la base para categorizar la enfermedad en leve, moderada y severa (Tabla 4). El 75 % de las pacientes con endometriosis leve, 50 % de las etiquetadas como endometriosis moderada y 33 % de las diagnosticadas como endometriosis severa pudieron concebir.

La clasificación de Acosta fue muy utilizada y alabada por su sencillez y capacidad pronóstica. Su uso generalizado permitió la comparación de resultados entre trabajos uniformes. Pero tampoco se salvó de críticas, surgiendo en los años siguientes varias modificaciones que, lejos de mejorar

notablemente el pronóstico reproductivo, introdujeron complejidad con menoscabo de su uso masivo (264, 265, 266).

Con el progreso de la laparoscopia, Cohen propuso una clasificación con 10 estadios que se basaba en hallazgos de esta técnica (267). Incorporó la presencia de enfermedad en lugares distantes de la pélvis, diagnosticadas mediante técnicas especiales como ultrasonidos, radiografías con contraste y otros procedimientos endoscópicos (Tabla 5).

En el año 1978, la American Fertility Society convocó a un grupo de expertos para estudiar la clasificación de la endometriosis. El informe de este comité (268) resultó en un esquema innovador basado en la progresión natural de la enfermedad, tipificándola con un sistema arbitrario de puntos acumulativos. La endometriosis fue definida como leve, moderada, severa y extensa de acuerdo a este sistema de puntaje. La clasificación AFS permitió la diferenciación no solamente entre enfermedad peritoneal y ovárica, sino también entre enfermedad unilateral y bilateral. Un enfoque similar se utilizó para estadiar la enfermedad de las Trompas de Falopio (Tabla 6).

Siete años más tarde, la American Fertility Society introdujo una revisión de la clasificación anterior (269) para dotar de un estadiaje estándar a la endometriosis, y así poder correlacionar los resultados del tratamiento quirúrgico con la severidad de la enfermedad. El estadio de enfermedad extensiva se eliminó y se utilizaron cuatro estadios: mínima, leve, moderada y severa. Se empleó una puntuación más detallada para diferenciar el compromiso peritoneal del compromiso ovárico. Además se establece una mejor diferenciación entre endometriosis superficial y profunda del peritoneo y de los ovarios. De igual modo se le atribuye una mayor puntuación a las adherencias firmes que a las laxas, y la obliteración del fondo de saco de Douglas automáticamente resulta en enfermedad severa. Si el anejo contralateral está ausente, la puntuación se duplica para el anejo comprometido (Tabla 7).

La intención de sus mentores fue que este esquema se utilizase

universalmente, tanto para pacientes estériles como para aquellas en las que la consecución de un embarazo no constituía un problema. La finalidad se consiguió, pero hoy, doce años más tarde, las dudas sobre la auténtica utilidad de esta clasificación circulan por varios ámbitos; reclamándose una nueva revisión.

Esta categorización está basada en el pronóstico en cuanto a la fertilidad, pero olvida el pronóstico sintomático o en relación con las recidivas o persistencias (270). No evalúa la influencia de la enfermedad en la bioquímica del peritoneo, ni las alteraciones inmunológicas locales o sistémicas, ni el aspecto o la actividad metabólica de las lesiones. Se necesita ciertamente perfeccionar el presente sistema.

En relación con este aspecto de permanente controversia, Blasco (271) señala textualmente: "Puntuaciones científicamente basadas para cada lesión, y un registro para la actividad de la enfermedad será fundamental para una clasificación que funcionará como un valioso sistema experto, y se convertirá en la clasificación de la endometriosis del siglo XXI".

La increíble tendencia humana a organizar y clasificar todo lo que se le presenta, fundamento para alcanzar una mejor comprensión de las cosas, ha conducido, en este proceso, a la creación de clasificaciones múltiples de aspectos parciales de la endometriosis. Destacan las clasificaciones de los implantes peritoneales profundos (272) o la de los endometriomas ováricos (273).

Tabla 2. Estadios quirúrgicos de la endometriosis introducidos por Huffman.

ESTADIO	DESCRIPCION
Ia	Limitado a los ligamentos uterosacros
Ib	Limitado a un ovario
Ic	Implantes superficiales peritoneales
IIa	Extensa afectación de un ovario, y menor compromiso del segundo
II b	Implantes superficiales en ambos ovarios
II c	Implantes superficiales en intestino
II d	Lesiones infiltrantes del útero o ligamentos uterosacros
III a	Extensa infiltración en ambos ovarios
III b	Quistes ováricos endometriósicos bilater.
III c	Lesiones rectovaginales de invasión profunda
III d	Implantes infiltrativos intestinales no obstructivos
IV a	Invasión vesical
IV b	Invasión intestinal obstructiva
IV c	Afectación ureteral

Huffman. Am J Obstet Gynecol 1951; 62.

Tabla 3. Estadios de Beechan

ESTADIO	DESCRIPCION
1	Focos dispersos, pequeños, en algún lugar de la pélvis. Diagnosticados sólo por laparoscopia
2	Ligamentos uterosacros, ligamentos anchos, cérvix, y los ovarios colectiva o individualmente fijos, reblandecidos, nodulares y un tanto agrandados de tamaño.
3	Lo mismo que el estadio 2, con los ovarios al menos a dos veces de su tamaño normal; ligamentos uterosacros, recto y anexos confluentes. El fondo de saco está obliterado
4	Compromiso masivo. Las visceras pélvicas no pueden ser claramente distinguidas por palpación

Beechan CT. Obstet Gynecol 1966; 28.

Tabla 4. Clasificación de Acosta de la endometriosis

ESTADIO	DESCRIPCION
LEVE	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lesiones frescas dispersas en los fondos de saco anterior o posterior, o peritoneo pélvico. 2. Escasos implantes superficiales en el ovario, sin endometriomas y sin adherencias periováricas. 3. Ausencia de adherencias peritubulares.
MODERADA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Endometriosis que involucra a uno o ambos ovarios, con varias lesiones superficiales, con cicatrización y retracción, o pequeño endometrioma. 2. Adherencias periováricas mínimas. 3. Adherencias peritubáricas mínimas. 4. Implantes superficiales en los fondos de saco. Algunas adherencias sin invadir el sigmoide.
SEVERA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Endometrioma de uno o ambos ovarios > 2x2 cm 2. Uno o ambos ovarios unidos por adherencias tubáricas. 3. Una o ambas trompas unidas u obstruidas por endometriosis; adherencias o lesiones asociadas 4. Obliteración del fondo de saco por adherencias o lesiones asociadas con endometriosis. 5. Engrosamiento de los ligamentos uterosacos y lesiones por endometriosis invasiva. 6. Compromiso significativo del intestino y la vejiga.

Acosta AA. Obstet Gynecol 1973; 42.

Tabla 5. Clasificación laparoscópica de Cohen.

ESTADIO	DESCRIPCION
<i>Endometriosis leve</i>	
I	Implantes superficiales en un sitio
II	Implantes superficiales en dos o más sitios
<i>Endometriosis moderada</i>	
III	Implantes con cicatrización y fibrosis; adherencias leves.
IV	Ovarios moderadamente adheridos a los implantes endometriósicos.
V	Múltiples implantes en los ovarios, peritoneo vesical, ligamentos con adherencias.
<i>Endometriosis severa</i>	
VI	Quiste endometriósico unilateral o bilateral sin afectación tubárica.
VII	Igual que la anterior con afectación tubárica
VIII	Adenomiosis.
IX	Endometriosis severa, mas EIP.
X	Afectación extragenital .

Cohen MR. J Reprod Med 1979; 23.

Tabla 6. Clasificación de la AFS (1978).

Estadio I Leve 1-5

Estadio II Moderada 6-15

Estadio III Severa 16-30

Estadio IV Extendida 31-54

PERITONEO	Endometriosis	<1 cm	1-3 cm	> 3 cm
		1	2	3
	Adherencias	Laxas	Densas/obliteración parcial del fondo de saco	Densas/obliteración parcial del fondo de saco
		1	2	3
OVARIOS	Endometriosis	<1 cm	1-3 cm	> 3 cm
	D	2	4	6
	I	2	4	6
	Adherencias	Laxas	Densas/compromiso parcial del ovario	Densas/compromiso total del ovario
	D	2	4	6
	I	2	4	6
TROMPAS	Endometriosis	<1 cm	> 1 cm	Oclusión tubárica
	D	2	4	6
	I	2	4	6
	Adherencias	Laxas	Densas/distorsión tubárica	Densas/oclusión tubárica
	D	2	4	6
	I	2	4	6

Tabla 7. Clasificación de la AFS modificada (1985).

Nombre de la paciente _____ Fecha _____

Estadio I (Mínima) 1-5 Laparoscopia _____ Laparotomía _____ Fotografía _____

Estadio II (Leve) 6-15 Tratamiento recomendado _____

Estadio III (Moderada) 16-40 _____

Estadio IV (Severa) > 40 _____

TOTAL _____ Pronóstico _____

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
OBLITERACION FONDO DE SACO POSTERIOR	Parcial	Completa		
	4	40		
Ovario	ENDOMETRIOSIS	1/3 Compromiso	1/3-2/3 Compromiso	> 2/3 Compromiso
	D Tenues	1	2	4
	Densas	4	8	16
	I Tenues	1	2	4
	Densas	4	8	16
Trompa uterina	D Tenues	1	2	4
	Densas	4	8	16
	I Tenues	1	1	4
	Densas	4	8	16

Tratamiento

Hemos observado cómo se han modificado las opciones terapéuticas a lo largo de la historia, desde las extirpaciones quirúrgicas iniciales hasta la euforia de los tratamientos médicos en los años 80.

En la actualidad domina un sentimiento de escepticismo entre los ginecólogos en cuanto a las posibilidades de los tratamientos disponibles. A pesar del importante abanico de modalidades terapéuticas, sólo la castración consigue la resolución de la enfermedad; y a este remedio podría, con acierto, aplicársele el dicho popular "muerto el perro se acabó la rabia".

En medicina, únicamente los tratamientos etiopatogénicos logran la curación de los procesos morbosos. El resto de los tratamientos han de considerarse paliativos. El desconocimiento de la etiopatogenia concreta de la endometriosis es lo que ha limitado hasta ahora la instauración de una terapia resolutive.

Pero, a pesar de las numerosas cuestiones por resolver en esta enfermedad, los clínicos se han visto obligados a formular enfoques terapéuticos para aliviar los padecimientos de sus pacientes.

Llegados a este punto, no es nuestro propósito describir exhaustivamente todas las opciones de una manera pormenorizada, sino reflejar sucintamente de lo que se dispone y, de un modo comparativo, qué se puede conseguir con ello.

Los objetivos del tratamiento son: Alivio de los síntomas, disminución o desaparición de los implantes endometriósicos y restauración de la fertilidad.

Las posibilidades terapéuticas disponibles son múltiples: Conducta

expectante, tratamiento sintomático, tratamiento médico hormonal, tratamiento quirúrgico conservador, tratamiento médico-quirúrgico y técnicas de reproducción asistida.

Conducta expectante

Se ha planteado esta actitud en los estadios precoces de la enfermedad (mínima, leve), basándose en el dato de que la tasa de embarazos fue similar en pacientes con placebo que en los que usaron cualquier otra modalidad terapéutica (157, 274).

Sin embargo, todavía no está claro si ese porcentaje de embarazos es el resultado de un efecto terapéutico, poco caracterizado todavía, de los posibles gestos realizados en la laparoscopia diagnóstica (dilatación cervical, cromoperturbación, aspirado de líquido peritoneal), o por el contrario representa la auténtica tasa de fecundidad de estas parejas (275).

Cuando en el tercer Congreso Mundial de Endometriosis, celebrado en Bruselas en 1992, se preguntó sobre si se debía tratar la endometriosis mínima, la audiencia dió un inconclusivo 49.9% al sí y 50.1% al no (276).

Pero los razonamientos previos han sido establecidos en base al compromiso de los aspectos reproductivos; y los objetivos del tratamiento habíamos convenido en que eran más amplios. Si no se trata a una paciente, no mejora su sintomatología y no se evita la progresión de la enfermedad (277).

Tratamiento sintomático

En el capítulo dedicado a la clínica y fisiopatología de la

enfermedad señalé los mecanismos propuestos para explicar las manifestaciones álgicas que la acompañan. Para paliar estos síntomas se han empleado tratamientos médicos múltiples e intervenciones quirúrgicas específicas.

Analgésicos menores, espasmolíticos y mórficos se consumen de manera incontrolada, no existiendo estudios que permitan evaluar su beneficio real.

Conociendo la probable implicación de las prostaglandinas en la fisiopatología del dolor, diversos autores han comunicado la eficacia de los fármacos antiprostaglandínicos para el control de la dismenorrea (278).

El tratamiento médico sintomático mejora la dismenorrea, pero ni la cura, ni disminuye la extensión o progresión de la enfermedad, ni modifica las tasas de fertilidad (277).

La neurectomía presacra ha sido la intervención mayoritariamente empleada para combatir el dolor pélvico. En 1949 Cotte publicó su experiencia sobre 1500 intervenciones, logrando éxito en el 98% de los casos (279). Hoy se la conoce con dicho epónimo (intervención de Cotte). Consiste en interrumpir los nervios presacros que se originan en el plexo hipogástrico intermedio y superior. En casos de dismenorrea secundaria se comunicó un éxito global del 72% (280). Laparoscopistas expertos han logrado efectuar dicha técnica por endoscopia, con resultados favorables en más del 90% de los pacientes (281).

La otra técnica quirúrgica propuesta como alternativa ha sido la sección de los ligamentos uterosacros. Encontró su sitio debido a que la intervención de Cotte no interrumpía completamente toda la inervación del cérvix (282). Hoy se practica por vía laparoscópica bajo la denominación de LUNA (Laparoscopic uterine nerve ablation). Se realiza una vaporización con Laser CO₂ de los ligamentos uterosacros a nivel de su inserción en el cérvix (45). En general se consigue mejoría en el 80% de los casos (283).

Al igual que los tratamientos médicos, estas intervenciones quirúrgicas no actúan sobre la fertilidad ni modifican el desarrollo de la enfermedad, aunque pueden suponer la resolución de la dismenorrea.

Recientemente la American Fertility Society ha elaborado un documento de consenso sobre la conducción de la endometriosis en presencia de dolor pélvico (284).

Tratamiento médico hormonal

Las terapias hormonales con estrógenos solos o con andrógenos, usadas en el pasado, son ya anecdóticas y su aplicación está severamente contraindicada en el momento actual.

Los argumentos que justificaron la manipulación hormonal se centraron en la observación de que la endometriosis precisaba los estrógenos para su desarrollo. La enfermedad era excepcional antes de la menarquía y varios años después de la menopausia. Además, la endometriosis se presentaba raramente en multíparas. Cuando se conseguía gestación, la sintomatología clínica disminuía, persistiendo la mejoría durante el periodo de lactancia en que la mujer se mantenía amenorreica, para recurrir al comenzar a menstruar (285).

De este modo, los tratamientos hormonales propuestos persiguen crear un estado de hipoestronismo (Agonistas de GnRH, Danazol, Gestrinona) o un estado de "pseudoembarazo" con una dominancia gestagénica (Estrógenos o gestágenos aislados).

Los gestágenos actúan por dos mecanismos. Por un lado, inhiben a la GnRH hipotalámica, ocasionando anovulación e hipogonadismo hipogonadotropo (286). Por otro lado, se ha demostrado un efecto antiproliferativo directo del acetato de medroxiprogesterona sobre las células del

estroma endometrial cultivadas in vitro (287). El resultado final es la deciduización y posterior atrofia del tejido endometrial.

El más utilizado ha sido el acetato de medroxiprogesterona a dosis de 30 mg/día, durante periodos de tres a seis meses.

La administración de forma continua de dosis crecientes de estrógenos y gestágenos constituye el antiguo régimen de "pseudoembarazo". Se ha venido usando en los últimos 30 años en pautas de administración oral, con dosis inicialmente crecientes y luego decrecientes para evitar las hemorragias por disrupción. Actúan por deciduización y atrofia de los implantes, lo que se consigue más fácilmente con gestágenos más potentes. Estas pautas antiguas están actualmente abandonadas (288).

Hoy se recurre con cierta frecuencia a los anticonceptivos orales en pacientes con estadios precoces y no deseo gestacional (289). En estos casos se recomiendan preparados de baja dosis estrogénica, debido a que dosis superiores a 50 microgramos de etinilestradiol podrían estimular el crecimiento de focos endometriósicos (93).

La Gestrinona es un 17-Noresteroide que se une de forma lábil al receptor de progesterona, sin tener efecto sobre receptores estrogénicos. Se empleó inicialmente como anticonceptivo masculino y femenino, administrándose una vez a la semana. Generalmente se comporta como antigestagénico, aunque a veces puede tener un discreto efecto agonista de progesterona. Tiene también un efecto androgénico débil, que puede incrementarse al disminuir la proteína sérica transportadora de hormonas sexuales, dejando más cantidad de testosterona libre. Del mismo modo, bloquea el desarrollo folicular al suprimir el pico de FSH y LH, resultando un ambiente hormonal acíclico con estradiol en el rango de 55-90 picogramos/ml (290). Este efecto antiestrogénico se ve reforzado por una depleción de los receptores estrogénicos con inhibición del reciclaje de los mismos (291). Su larga vida media permite una cómoda administración de 2.5 mg, dos veces por semana. Se ha ensayado su administración por vía vaginal con

la misma eficacia que la vía oral y con menores efectos secundarios (292).

Danazol es un derivado isoxazol de la 17 alfa etinil testosterona. Fue introducido en clínica para el tratamiento de la endometriosis en 1971 (53). Desde entonces, ha sido el fármaco más empleado y referencia obligada para comparar los resultados de otras modalidades terapéuticas. La sustancia presenta múltiples interacciones con el sistema endocrino, proteínas transportadoras, sistema inmunológico e incluso, actuación directa sobre glándulas o estroma endometriales y endometriósicos. Se sabe que Danazol disminuye la síntesis hepática de proteína transportadora de esteroides sexuales. Su fijación a esta proteína a nivel periférico desplaza de su unión a testosterona, determinando así sus importantes efectos androgénicos (293). El estado hipoestrogénico que ocasiona se produce tanto por inhibición hormonal del gonadotropo, como por inhibición directa de los enzimas encargados de la esteroidogénesis (294).

Se ha documentado una inhibición de la producción de autoanticuerpos en pacientes con enfermedades autoinmunes, considerándose al Danazol como un modificador de la respuesta inmune del huesped (295).

Por último, he de destacar la sugerencia de que la droga podría actuar sobre receptores de andrógenos o Progesterona a nivel del endometrio eutópico o ectópico, determinando una detención en la proliferación celular.

Se ha empleado por vía oral a dosis de 400-800 mg/día, durante periodos de cuatro a seis meses. Para que sea efectivo ha de conseguirse amenorrea. Algunos trabajos han relacionado la efectividad de Danazol y agonistas de GnRH con los niveles séricos de estradiol en las pacientes tratadas. Dickey (297) señala que para obtener una remisión completa de la endometriosis en estadios severos se precisaría disminuir el estradiol sérico a cifras inferiores a 15 picogramos/ml. Si se tratase de enfermedad moderada el estradiol debería ser inferior a 22 picogramos/ml; y con niveles inferiores a 41 picogramos/ml se conseguiría la remisión completa en la endometriosis leve (296). Otros autores no comparten tal aseveración.

En los últimos años, varios grupos japoneses han comunicado su experiencia con la administración local de Danazol (298, 299). Comprobaron que el empleo del fármaco mediante supositorios vaginales, anillos vaginales de liberación retardada o soluciones intrauterinas transcervicales fue más efectivo que la administración oral. No se detectaron niveles de Danazol en plasma, ni se suprimió el eje hipofiso-ovárico y, por tanto, la ovulación. Tampoco hubo efectos secundarios anabólicos, androgénicos o aumento de transaminasas. La disminución del tamaño de las lesiones fue más rápida que tras administración oral, y la tasa de embarazos mayor. Estos brillantes resultados esperan, naturalmente, confirmación.

La estructura del GnRH nativo fue descrita en 1971 (300). Ante la necesidad de aumentar su vida media, que para el decapeptido natural es de 3.5 minutos, se crearon en poco tiempo análogos sintéticos. Multitud de estos preparados han sido ensayados en el laboratorio y se pueden dividir en dos grandes grupos: Compuestos de acción agonista, es decir, estimuladores, al menos inicialmente, y otros cuya acción es antagonista. Debido a la presencia de efectos colaterales importantes, los compuestos antagonistas han visto frenado su desarrollo y su introducción en la clínica. Lo contrario ha ocurrido con los agonistas de la GnRH (301).

Cuando se administra un agonista, la mayoría de los receptores de GnRh hipofisarios se ocupan y posteriormente se internalizan. Este hecho produce una liberación suprafisiológica de FSH y LH en las primeras 24 horas, lo que se conoce como efecto "Flare-up". Si la administración del agonista es continua, se produce un agotamiento paradójico de la respuesta del gonadotropo mediada por varios mecanismos (302):

A. "Down regulation" o reducción del número de receptores para GnRH con la consiguiente disminución en la génesis de AMP cíclico.

B. Desensibilización homóloga del receptor. Este es un fenómeno de agotamiento de las señales intracelulares post-receptor, tales como la apertura de los canales

del calcio o el metabolismo del fosfatidilinositol, responsables de la activación del sistema de la proteinkinasa C, mensajeros de la acción hormonal.

C. Reducción de la biosíntesis de FSH y LH por fallo de los mecanismos responsables de la transcripción genética que codifica la síntesis de gonadotrofinas.

Como consecuencia de todo lo anterior se produce un hipogonadismo hipogonadotropo que ha tenido amplia aplicación en ginecología. Las pacientes con endometriosis se benefician especialmente con el empleo de este fármaco (303-313).

En los últimos años se han adquirido nuevos conocimientos sobre la farmacocinética y farmacodinamia de estas drogas. El grupo de Lemay comprobó que en respuesta a una infusión continua de Buserelín se producía un exceso de LH, siendo predominantemente LH alfa inmunoreactiva. La pérdida de la efectividad de la LH bioactiva era debida a la disminución de la subunidad beta de la cadena de LH (314).

De otro modo, se han podido localizar receptores de GnRH en tejido endometrial (315). Este hallazgo abre la posibilidad de que el fármaco actúe directamente sobre los implantes endometriósicos, y no sólo a través del estado hipoestrogénico que provoca.

Administradas por vía oral estas sustancias son inactivas. Se utilizan las aplicaciones intranasales en spray y las vías parenterales subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Las formas depot son bien aceptadas y constituyen hoy las modalidades más empleadas. Existen actualmente formulaciones de administración cada 30 o 60 días.

Otros fármacos empleados de forma experimental o en protocolos de investigación clínica han sido:

Antagonistas de GnRH. Su limitación principal, ya señalada, ha sido la aparición

de reacciones anafilácticas por liberación de histamina. Sin embargo, experimentalmente han mostrado ser eficaces (316).

Clomifeno. Fundamentalmente estudiado en relación con la infertilidad debida a endometriosis, pero sin datos respecto a la evolución de los implantes o la sintomatología (317).

Mifepristona (RU 486). En un estudio se menciona una clara mejoría clínica sin reducción laparoscópica de la extensión de la enfermedad (318).

Gossypol. Abandonado por sus efectos tóxicos renales y por su capacidad de producir fallo gonadal irreversible, se ha invocado como efectivo en la endometriosis (319).

Tamoxifeno. Se ha sugerido su utilidad en esta enfermedad debido a sus efectos antiestrogénicos (320). Sin embargo, como esta sustancia tiene una acción antagonista/agonista de estrógenos, es posible que cierta estimulación estrogénica del aparato genital ocurra y se reactiven focos endometriósicos que habían quedado quiescentes tras la menopausia (321, 322, 323).

Una vez descritas individualmente cada una de las opciones de tratamiento médico y sus respectivos mecanismos de acción conocidos, señalaré a continuación, de forma comparativa, los efectos globales sobre cada uno de los tres objetivos del tratamiento (Alivio sintomático, reducción de los implantes y restauración de la fertilidad).

Las diferentes pautas terapéuticas han mostrado ser eficaces en el alivio del dolor pélvico y la dismenorrea relacionados con la endometriosis. Proporcionan mejoría en más del 80% de las pacientes. En este sentido, ninguno de los fármacos es más eficaz que otro. No consiguen curación a largo plazo, siendo las recurrencias más frecuentes conforme transcurre el tiempo (30-60% en el primer año). No obstante, los síntomas suelen ser menos intensos que antes del tratamiento y sólo un 20% de las pacientes necesitarán tratamiento posterior

(277, 309, 312, 324, 325, 326).

Los tratamientos hormonales se han mostrado moderadamente eficaces para reducir la extensión de la enfermedad. Cuando la laparoscopia se realiza inmediatamente al finalizar el tratamiento muestra una alta tasa de remisiones (70-100%) frente al placebo (18-30%). Pero dichas tasas de remisión no perduran en el tiempo, siendo la recidiva la tendencia natural en la mayoría de los casos (327). No parece que un fármaco sea más eficaz que otro (277, 328).

Las mujeres que recibieron tratamiento hormonal para la esterilidad asociada a endometriosis tuvieron unas tasas globales de embarazo de 10-60%, durante el primer año. Ninguno de los fármacos mostró más eficacia que otro, y tampoco se mostraron más eficaces en los estadios I y II que un placebo o una conducta expectante (274-277).

Como hemos comprobado, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas terapias hormonales para cualquiera de los tres objetivos básicos del tratamiento. De este modo, el factor que influiría de forma más importante en la elección de una modalidad u otra sería la tolerancia a los efectos secundarios.

El efecto adverso más importante de los gestágenos es la alteración menstrual. Intolerancias digestivas, aumento de peso, edemas y tensión mamaria son otras manifestaciones menos frecuentes de estas sustancias. A las dosis recomendadas, no parecen alterar peligrosamente el perfil lipídico (286).

Los preparados estro-gestagénicos empleados actualmente como anticonceptivos orales tienen mínimo contenido estrogénico y gestágenos de última generación con perfiles farmacológicos mínimamente nocivos. En todo caso, las últimas recomendaciones, efectuadas tras la reciente polémica surgida en relación con las nuevas píldoras anticonceptivas, insisten en la valoración del riesgo cardiovascular antes de su uso.

La Gestrinona no parece tener efecto sobre la función hepática y modifica de forma poco trascendente el perfil lipídico. Sus efectos antiestrogénicos son manifiestos con el uso prolongado. Los efectos androgénicos, aún siendo menores y mejor tolerados que los inducidos por Danazol, pueden ser potencialmente irreversibles (277, 291).

Probablemente el Danazol sea el fármaco peor tolerado. Crea un estado hiperandrogénico manifiesto y una reducción de estrógenos menos intensa que los agonistas de GnRH. Si se emplea durante tiempo prolongado, también son notorios sus efectos anabólicos, con incremento de peso. Además puede alterar el funcionamiento hepático y el perfil lipídico, incrementando notablemente el riesgo aterogénico. El porcentaje de abandonos del tratamiento es mayor que con el resto de los tratamientos (329-332).

Los análogos de GnRH no tienen efecto sobre el metabolismo lipídico, ni sobre la función hepática, ni acción androgénica, anabólica o gestagénica. Sus efectos indeseables derivan del profundo estado hipoestrogénico que, aunque reversible, puede dejar secuelas permanentes. Efectivamente, Dodin encontró que la pérdida ósea provocada por estos fármacos no había revertido seis meses después de finalizado el tratamiento (331). Otras manifestaciones frecuentes de la hipoestrogenemia son los sofocos, sequedad vaginal, descenso de la libido, cefaleas y cambios del humor (325, 329, 333, 334).

Algunos autores han puesto de manifiesto efectos poco conocidos de los agonistas de GnRH, como modificaciones favorables del perfil lipídico (330) o desfavorables del perfil hidrocarbonado (335). Con todo, estos fármacos son los mejor tolerados, con un porcentaje de abandonos menor, lo que los ha convertido en el tratamiento de referencia en el momento presente (332, 336).

Los efectos secundarios han supuesto una limitación para el empleo prolongado de sustancias agonistas de GnRH. Para evitar las consecuencias del hipoestrogenismo sin disminuir la eficacia sobre la enfermedad, se ha sugerido la asociación, a bajas dosis, de compuestos con acciones estrogénicas y/o

gestagénicas ("add-back therapy"). Así, existen estudios utilizando Acetato de medroxiprogesterona, Noretisterona, Estradiol transdérmico o Tibolona (277, 301). Este último es el único que ha logrado, de momento, todos los fines deseados sin perjuicio sobre la endometriosis. No obstante, estas consideraciones han de entenderse como preliminares todavía (337).

Tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico puede ser realizado por vía laparoscópica o laparotómica. En el primero de los casos, se practica la extirpación de los focos endometriósicos mediante pinza de Semm y ayuda de tijeras. También puede efectuarse coagulación de implantes y adherencias con técnica de electrocoagulación bipolar, monopolar, termocoagulación o vaporización por Láser. Con habilidad es posible, de igual modo, la cistectomía de endometriomas.

La vía laparotómica está quedando cada vez más restringida a los casos avanzados, frente a los adelantos de la técnica laparoscópica. Se recomienda que cada cirujano recurra a una u otra táctica según su propia experiencia. Cuando se elige la vía laparotómica, ésta deberá encuadrarse en los principios de la microcirugía, con prohibición del empleo de gasas, con irrigaciones y lavados frecuentes, manoseo escaso de los tejidos, hemostasia cuidadosa y peritonización de todos los tejidos con suturas finas reabsorbibles (253).

Los resultados clínicos de los tratamientos quirúrgicos son irregulares. Las recidivas existen, aunque con menor incidencia que con el tratamiento médico. Con cirugía se consiguen tasas de gestación medias del 50%, siendo el porcentaje de éxitos inversamente proporcional al grado de severidad de la endometriosis (4, 45, 338, 339).

La cirugía de la endometriosis es, en general, complicada. La distorsión de las estructuras y los frecuentes y manifiestos cuadros adherenciales hacen de esta enfermedad una tarea poco adecuada para cirujanos con menor experiencia y habilidad. Las dificultades pueden multiplicarse cuando se aborda por vía laparoscópica. En las mejores manos el índice de complicaciones se sitúa en el 0.3% (340, 341).

Tratamiento combinado médico-quirúrgico

La combinación de ambos tratamientos es un aspecto de máxima controversia en la actualidad.

Aquellos en favor de medicar a las pacientes antes de la cirugía arguyen que se van a reducir y fibrosar las lesiones, disminuyendo la hemorragia quirúrgica y reduciendo el riesgo de formación de nuevas adherencias. También se hace hincapié en la mayor facilidad para la extirpación de los endometriomas después de un tratamiento médico (342). Quien argumenta en contra, manifiesta que la fibrosis creada va a hacer más difícil la cirugía. Algunas lesiones se pueden reducir hasta el punto de que los focos residuales sean poco perceptibles, no actuando sobre ellos la cirugía (343).

No parece, por tanto, que el tratamiento médico preoperatorio aporte beneficios en todas las endometriosis. Tampoco parece demostrado que mejoren las tasas de embarazo frente a otras modalidades terapéuticas (277, 301).

Con respecto a la supresión hormonal postoperatoria, algunos autores esgrimen como ventaja la posibilidad de actuar de este modo contra focos remanentes microscópicos no extirpados; o en los casos en que se haya producido una diseminación involuntaria durante la intervención, como rotura de un endometrioma (344, 345). Como desventaja se menciona su posible influencia sobre la cicatrización y la prolongación del tiempo de infertilidad en un momento

en que las posibilidades de beneficiarse del tratamiento quirúrgico son máximas (343).

Los resultados recientemente comunicados en la disminución de los síntomas y recuperación de la fertilidad con el tratamiento médico postoperatorio, no parecen aconsejar su uso rutinario (346). Sin embargo, la enorme dispersión de las metodologías seguidas en los distintos trabajos hacen muy difícil la elaboración de conclusiones generales con respecto a este punto.

Técnicas de reproducción asistida

La superovulación con HMG en mujeres estériles con endometriosis mínima y leve se ha asociado a una tasa superior de fecundabilidad mensual, aunque no a una mejor tasa acumulativa de gestaciones, que la simple expectación. Se acelera la consecución de la gestación que se hubiera producido de todos modos con mayor tiempo de espera (347).

Analizando los aspectos conocidos de la fisiopatología de la esterilidad causada por endometriosis, varios autores han encontrado suficientes argumentos como para recomendar la estimulación del desarrollo folicular, inducción de la ovulación, soporte de la fase lútea e inseminación de las pacientes (301).

Desde los primeros años de difusión de la fertilización in vitro, todas las etapas de la endometriosis han sido señaladas como susceptibles a la indicación de este procedimiento (348, 349, 350).

En los casos de endometriosis severa con adherencias u obstrucción tubárica el empleo de la fertilización in vitro no parece ofrecer dudas (351). También parece recomendable recurrir a ella después de un tratamiento quirúrgico fallido (352). En casos de endometriosis mínima o leve la

conveniencia de su utilización es menos clara y su eficacia respecto a otras opciones no ha sido suficientemente demostrada (353).

La colocación de ovocitos y espermatozoides directamente en la Trompa de Falopio (GIFT) podría presentar ventajas en esta enfermedad. Conocida la perturbación en el fluido peritoneal que ocurre en las endometriosis leves/moderadas, que condiciona dificultades funcionales en la captura del óvulo o en la supervivencia y desenvolvimiento del espermatozoide, esta técnica se mostraría eficaz para superar tales inconvenientes (351, 354). Los resultados obtenidos parecen corroborar las afirmaciones previas (355). Algunos investigadores recomiendan su empleo en estadios leves durante la propia laparoscopia diagnóstica (356).

En pacientes con fallos repetidos en programas de fertilización in vitro se ha intentado la donación de ovocitos. Los resultados obtenidos han sido buenos, con porcentajes de embarazo por trasferencia del 50% e implantación embrionaria del 20%. No existieron diferencias entre mujeres con endometriosis y pacientes a las que se realizó la donación de ovocitos por otras causas, cuando las donantes eran mujeres sin endometriosis (357).

La realidad es que las medidas terapéuticas disponibles ofrecen un beneficio limitado. Los tratamientos médicos, que parecen tan eficaces a corto plazo, no lo son tanto cuando la experiencia demuestra que tras varios meses de recuperarse la función menstrual normal la endometriosis se encuentra en el mismo grado inicial. La cirugía presenta, de igual modo, una alta incidencia de recidivas. Ser condescendientes en las indicaciones quirúrgicas puede llevar a una paciente a visitar el quirófano tres o cuatro veces en su vida, y terminar con una cirugía radical arriesgada y de alta morbilidad (358).

Venturini, en una reciente revisión del tema (359), nos ofrece una visión actual y nos descubre el futuro. "La eficacia de los tratamientos médicos para el manejo de la endometriosis se ha documentado en varios ensayos clínicos, pero los resultados no siempre se mantienen tras la suspensión. El tratamiento

quirúrgico, por laparoscopia o laparotomía, presenta recurrencia en un 20% de los casos en seguimientos a largo plazo. El aspecto de la endometriosis es heterogéneo, su estado funcional es variable y podría perder su respuesta hormonal. Después de tratamientos medico-quirúrgicos combinados, la persistencia de fallo de los mecanismos de defensa permiten o favorecen la recurrencia de la enfermedad. Desafortunadamente todos los sistemas de clasificación de la endometriosis han fracasado en identificar las manifestaciones de la enfermedad que respondan de una manera predecible a estímulos específicos. Un análisis del aspecto morfológico, actividad biológica de los implantes y del sistema inmune que los envuelve, podría definir mejor el papel que cada tratamiento debe tener en la endometriosis ".

A pesar de las grandes divergencias en múltiples aspectos de la enfermedad, todos coinciden con Gleicher en que es necesaria una nueva aproximación terapéutica a la misma (360).

Fundamentos etiopatogénicos para la elaboración de la hipótesis

En conexión directa con el último párrafo del capítulo anterior, el conocimiento de los aspectos inmunológicos de la endometriosis aporta las bases para una original aproximación a la enfermedad. Una aproximación que abre nuevos horizontes y que mantiene, frente al pesimismo actual, la confianza en un futuro prometedor.

El riesgo de desarrollar endometriosis comienza en la pubertad y se extiende hasta la menopausia en todas las razas. El camino más importante en la histogénesis de la enfermedad es la trasplatación de células endometriales en la pélvis y otros órganos vía menstruación retrógrada (156). Infinidad de evidencias experimentales y clínicas lo confirman (43, 361, 362, 363). Sin embargo, es bien cierto que este mecanismo por sí solo no puede explicar todos los casos de endometriosis.

Embriológicamente el conducto mülleriano se origina en el seno de la cavidad celómica y, por tanto, los tejidos relacionados con el epitelio celómico y el epitelio mülleriano tienen un origen ancestral común. Este razonamiento fue utilizado por Meyer para elaborar su teoría de la metaplasia celómica. La metaplasia celómica nunca ha podido ser demostrada científicamente, pero en los últimos tiempos algunos investigadores la han defendido de nuevo (27). Sugieren que los tejidos derivados del epitelio celómico y las células mesenquimales acompañantes, denominadas ya por Lauchlan como "Sistema mülleriano secundario", tienen la potencialidad de diferenciarse en epitelio y estroma müllerianos. Esta teoría explicaría la aparición de la enfermedad en mujeres con agenesia mülleriana (sin útero o con este hipoplásico o no funcionando) y también en hombres (111).

La teoría de los restos celulares embrionarios derivados del conducto de Müller, y acantonados en forma quiescente en determinadas áreas topográficas del peritoneo pélvico (Teoría de Rusell), sigue siendo especulativa. Todavía no

se han demostrado restos celulares de este tipo en estudios histológicos del mesotelio peritoneal (111).

Cuando Javert en 1949 intentó integrar las distintas opiniones en una única teoría compuesta que incluyera fenómenos de metaplasia en algunos casos, exfoliación e implantación de células endometriales en otros, posibilidad de implantación directa y metástasis por vía linfática y hematógena, tuvo escasos seguidores. Los defensores de las distintas corrientes de opinión pretendían que su teoría fuese la única responsable de la histogénesis de la enfermedad (10). En estos momentos, probablemente todos los autores estarían de acuerdo con Javert.

Los últimos años han sido decisivos en la identificación de características bioquímicas y moleculares del endometrio eutópico, del ectópico, del mesotelio celómico y del líquido peritoneal que se encuentra contenido en él. En estos lugares se ha encontrado una pléyade de sustancias, cuyo número aumenta día a día, que pudiera tener un papel importante en la etiopatogenia de la enfermedad. Entre ellas se encuentran citokinas, factores de crecimiento como fibronectina, y endotelina (183-190, 364).

En 1941, Lavender estaba lejos de saber algo acerca de las sustancias mencionadas. Sin embargo, elaboró la denominada "Teoría inductiva de la endometriosis". La idea, tal como fue concebida por él, postulaba la existencia de sustancias solubles producidas por el endometrio uterino que pasando a la cavidad peritoneal activarían un blastema totipotencial para la formación del endometrio peritoneal (10). Aunque este razonamiento parte de una histogénesis metaplásica, el fundamento, es decir, la existencia de factores inductores del progreso de la endometriosis encaja con los conocimientos actuales.

Aceptando la menstruación retrógrada como un camino casi universal, aquellas mujeres con un riesgo particular de desarrollar la enfermedad tienen características menstruales que aumentan la cantidad y duración de la contaminación menstrual de la pélvis.

Existen pocas dudas respecto a que una alteración inmunológica desempeña algún papel en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los datos inmunológicos considerados conjuntamente, sugieren que las células endometriales de pacientes con endometriosis son menos sensibles a los mecanismos de defensa presentes, y como resultado se implantan y crecen (111).

El déficit inmunológico para remover detritus endometriales menstruales refluídos en la cavidad peritoneal, puede ser un factor independiente o dependiente de la cantidad de afluente a eliminar. Dicho de otra manera, la incompetencia inmunológica pudiera preexistir al margen de las características menstruales, o por el contrario, pudiera deberse a un desequilibrio entre la cantidad de menstruación retrógrada y la capacidad del sistema inmunológico para deshacerse de ella. Se trataría, en este último caso, de un déficit inmunológico parcial o relativo, que sólo se manifestaría en caso de "trabajo extra".

Sea como fuere, el convencimiento de los investigadores implicados en el estudio de la endometriosis de que los fenómenos inmunológicos participan de una manera trascendente en el desencadenamiento de la enfermedad, es unánime.

"Nuevas investigaciones epidemiológicas pueden ayudar a confirmar la posible relevancia de los mecanismos inmunes en el desarrollo de la endometriosis humana".

Merlene B. Goldman

Current Concepts in Endometriosis 1990

"Los avances más recientes e importantes en el estudio de la endometriosis se relacionan no con la causa y progresión de la enfermedad sino con anomalías en la inmunidad y el entorno peritoneal, que se derivan de ella".

J. A. Rock

Lancet 1992

"Durante estos años precedentes se han acumulado evidencias que relacionan la endometriosis con cambios en la inmunidad humoral y celular. Esto sugiere que la enfermedad puede ser un desorden sistémico más que una enfermedad inmunológica local y que la manipulación inmunológica puede tener potencial terapéutico".

W. P. Dmowski

Tercer Congreso Mundial de Endometriosis

Bruselas 1992

"Si uno cree que la endometriosis no es una enfermedad endocrina y si el concepto de, por lo menos, una contribución del sistema inmune, es aceptado, las opciones terapéuticas han de estar de acuerdo con ello".

Norbert Gleicher

Hum. Reprod. 1992

"Hasta que se acumulen más datos, en particular una intervención terapéutica eficaz, los fenomenos inmunológicos deben ser provisionalmente examinados con una crítica científica, mezcla de excitación y escepticismo".

Arthur F. Haney

Tercer Congreso Mundial de Endometriosis

Bruselas 1992

"Con la variabilidad existente en la expresión de receptores en el tejido endometriósico, ningún método hormonal tiene posibilidades de dar resultados satisfactorios en todas las pacientes.

La utilización de antagonistas de los factores de crecimiento o la modificación de los mecanismos inmunes ofrecen, probablemente, las mejores posibilidades de reducir la frecuencia de esta enfermedad".

Robert W. Shaw

Lancet 1992

"La inmunomodulación puede representar una alternativa muy útil y directamente dirigida a la fisiopatología de la endometriosis".

A. Steinleitner

Tercer Congreso Mundial de Endometriosis

Bruselas 1992

"Los cambios funcionales en las células del sistema inmune, demostrados en los estudios recientes, producirían una disminución del reconocimiento y destrucción y un aumento de la supervivencia de las células endometriales desplazadas, facilitando su implantación y el consiguiente desarrollo de la endometriosis".

W. P. Dmowski

Acta Obstet. Ginecol. Scand. 1994

"Una serie de inmunomoduladores no específicos parecerían representar una nueva y prometedora estrategia terapéutica para atacar a la endometriosis en sus raíces".

Norbert Gleicher

Br. J. Obstet. Gynaecol. 1995

"Las investigaciones futuras sobre la endometriosis pueden depender de nuestro conocimiento de la actuación bidireccional de la telaraña de citokinas sobre los sistemas inmune y endocrino".

J. E. Rier

Environ Health Perspect. 1995

"El hallazgo de la disminución de la actividad NK en estadios avanzados de la endometriosis sugeriría un papel potencial para la inmunoterapia, con el objetivo de devolver a estas células la operatividad perdida".

T. J. Wilson

Fertil. Steril. 1995

Fisiología del Sistema Inmune

El conocimiento del sistema inmunológico y la comprensión de sus conceptos básicos son limitados para la mayoría de los médicos. El motivo habría de atribuirse a razones históricas y taxonómicas. La mayoría de las especialidades médicas mayores tratan sistemas orgánicos que han sido reconocidos durante centurias como coherentes (Cardiología, Neurología, Gastroenterología etc...). La inmunología concierne a células y moléculas difundidas a través del cuerpo, cuyas conexiones funcionales no fueron evidentes hasta hace 50 años. Como resultado, los expertos en inmunología fueron un grupo heterogéneo de profesionales de la ciencia, desde zoólogos hasta psiquiatras, que se dedicaron al estudio de pequeños fragmentos del sistema inmune. Sólo cuando se reconoció su unidad fue evidente el progreso en su entendimiento (365).

El organismo está protegido por un doble mecanismo de defensa inmunológico: uno inespecífico, y otro caracterizado por la especificidad y la memoria o reconocimiento.

Los mecanismos de defensa inespecíficos están formados por los elementos que median en la inflamación, como monocitos/macrófagos, eosinófilos, mastocitos, cascadas del complemento y de la coagulación, células asesinas espontáneas (Natural Killer) y productos de secreción, de los cuales los más importantes son las citocinas o citokinas. Estas últimas se conocen como linfocinas o monocinas dependiendo de la célula que las produzca, aunque pueden derivar de células no inmunes como estroma y epitelio endometrial, ovocito, citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto, células de la teca ovárica etc...(366).

Los elementos implicados en los mecanismos de defensa específicos son los linfocitos T ó timodependientes y los linfocitos B, formados en la médula ósea.

La clasificación anterior, así como otras que mencionaremos más adelante han de entenderse como artificios para hacer comprensible el sistema. Todos los elementos funcionan interconectadamente en lo que se conoce como la "red o telaraña inmunoreguladora". La apreciación de su complejidad aporta la base para comprender cómo la simple perturbación de un sólo elemento puede alterar todo el sistema (367).

La sucesión de acontecimientos que ocurren cuando un elemento extraño penetra en el huesped, sigue siempre un orden concreto. Antes de que la respuesta inmune pueda comenzar, los antígenos derivados del invasor han de ser encontrados por células capaces de responder. Una vez localizados, deben existir mecanismos moleculares de reconocimiento. Tanto los receptores antígenoespecíficos de los linfocitos como los anticuerpos que eventualmente se formen, deben unirse y reconocer a las moléculas antigénicas. Habiendo reconocido a un antígeno, los linfocitos deben ser activados para responder. Para unos la respuesta consistirá en la producción de anticuerpos, para otros en la iniciación de un fenómeno inflamatorio. Pero, ni anticuerpos ni linfocitos activados pueden deshacerse de un invasor por ellos mismos. Ellos cooperan en un elaborado sistema de despliegue, amplificando y distribuyendo las funciones defensivas y, quizás más importante, colaborando con elementos inespecíficos,

como fagocitos y moléculas del sistema del complemento, en la destrucción y eliminación de patógenos. Finalmente, una amplia serie de sistemas de control constituyen la regulación inmune, en la cual la intensidad de una respuesta es corregida según la particular carga antigénica impuesta (365).

...el encuentro

Antes de que el sistema inmune de los vertebrados evolucionara, existían células "basura" o "carroñeras" especializadas en la recogida y destrucción de partículas extrañas. En muchas especies, estas células juegan un papel vital en la inducción de inmunidad. En los organismos superiores se las denomina células accesorias, y son los elementos directamente encargados de los mecanismos de encuentro o captura. Forman un grupo celular heterogéneo constituido por monocitos circulantes, macrófagos, histiocitos, células dendríticas, células de Kupffer etc...Se encuentran presentes en todos los tejidos, pero en mayor concentración en nódulos linfáticos y bazo. Los lugares que constituyen puerta habitual de entrada de elementos extraños, como los tractos gastrointestinal y respiratorio, tienen colecciones propias de células accesorias especializadas submucosas.

Desde el punto de vista funcional, estas células realizan tres misiones primordiales. En primer lugar, capturan y fragmentan elementos extraños en pequeñas partículas moleculares de tamaño apropiado para reaccionar con receptores superficiales de linfocitos. Dichos fragmentos antigénicos se denominan epítopos. En segundo lugar, fijan epítopos en su superficie, donde son retenidos durante largos periodos de tiempo, mostrándose accesibles a linfocitos migrados. En tercer lugar, producen secreción de alguna citocina, como interleukina-1 (IL-1), que intervienen en la activación de sucesivos elementos de la red (365).

Las células NK (citotóxicas o asesinas espontáneas) también forman parte del sistema de células accesorias, aunque sus funciones difieran

ampliamente de las de los macrófagos. Estas células se definen por su capacidad de lisis de una línea celular de eritroleucemia denominada K562, por poseer receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, y por presentar una morfología de linfocitos grandes granulares. En sangre periférica se identifican por la expresión de su antígeno terminal NK H1 (CD56) y de receptores Fc (CD16). Representan el 10-15% de los mononucleares y el 5-8% de todas las células blancas, de forma que se encontrarían en cantidad superior que los linfocitos B, aunque en cantidad 6 veces inferior que los linfocitos T.

Operativamente exhiben una actividad citotóxica espontánea, sin sensibilización previa ni reconocimiento de los antígenos del sistema de histocompatibilidad mayor (HLA), frente a células diana autólogas y alogénicas. Como disponen de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, pueden mediar citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Es decir, destruir directamente elementos aislados y también aquellos que han sido ligados por anticuerpos específicos. Sus respuestas no son lentas como las de los linfocitos T. Tras el estímulo de Interleukina-2 (IL-2) o Interferones, producen respuestas citotóxicas o proliferativas instantáneas (368).

...el reconocimiento

La capacidad de reconocimiento del sistema inmune está determinada por los denominados receptores específicos, que son moléculas dotadas de una gran variabilidad estructural que pueden originar millones de formas ligeramente diferentes. Esta diversidad de formas moleculares, determinada genéticamente, constituye el repertorio de especificidades de un determinado individuo, capaz de reconocer a todas las posibles conformaciones moleculares antigénicas de la naturaleza.

Las moléculas de reconocimiento son las inmunoglobulinas y los receptores de las células T. Ambos tipos de moléculas poseen una estructura tridimensional relativamente similar, con unos dominios constantes y unos

variables en los extremos carboxilo y amino terminal, respectivamente. Existen además zonas de hipervariabilidad, incluidas en estos dominios variables, que determinan su diversidad.

Las poblaciones linfocitarias B y T, poseen ancladas en su membrana citoplasmática y con una distribución clonal, moléculas de reconocimiento específico, las inmunoglobulinas y los receptores clonotípicos respectivamente. Frente a la semejanza estructural entre ambos tipos de moléculas, los mecanismos de reconocimiento y activación empleados por las células T y B son diferentes.

Los linfocitos B pueden reconocer y activarse por antígenos solubles, mientras que los linfocitos T requieren ver al antígeno sobre superficies celulares que expresen además marcadores de la propia identidad del organismo. Estos marcadores son moléculas de la membrana citoplasmática codificada por una familia de genes denominada sistema principal de histocompatibilidad (HLA). Se han identificado dos clases diferentes de estas moléculas. Las moléculas de clase I se expresan en la membrana citoplasmática de la práctica totalidad de las células, mientras que las de clase II únicamente aparecen en elementos del sistema inmune (369).

Existe además un sistema molecular, no antígeno específico, linfocinas y monocinas, que regula la activación y proliferación de las clonas linfocitarias, con la consiguiente amplificación de la respuesta inmune. A comienzos de los años 70, se comprobó la existencia de factores solubles producidos por las células T capaces de inducir a las células B a la proliferación y a la secreción de inmunoglobulinas (370). Sin embargo, el hecho crucial en la investigación de los factores solubles con capacidad de regulación de la funcionalidad linfocitaria fue el descubrimiento por Morgan del factor de crecimiento de los linfocitos T, posteriormente denominado Interleukina-2 (IL-2) (371).

Actualmente se conoce la existencia, la estructura bioquímica y la

función biológica de diversos factores solubles inmunoreguladores, a los que se engloba dentro de los conceptos de linfocinas y monocinas. Se pueden definir, por tanto, las linfocinas y monocinas como aquellas moléculas secretadas fundamentalmente por linfocitos T cooperadores o por macrófagos, capaces de regular la activación, proliferación y diferenciación de las células del sistema inmune (372). Las moléculas de este tipo mejor caracterizadas son: Interleukina-1, previamente denominada factor activador de linfocitos; Interleukina-2, previamente denominada factor de crecimiento de células T; Interleukina-3, demostrada en el sistema murino y previamente denominada factor estimulador de los mastocitos; Interleukina-4, con funcionalidad múltiple y capaz de emular las acciones de las Interleukinas 5 y 6 sobre las células B; Interleukina-5, previamente denominado factor de crecimiento de células B (BCGF); Interleukina-6, previamente denominado factor de diferenciación de células B (BCDF); Interleukina-8, que es un factor quimiotáctico de colonias hemopoyéticas ; Interferones, cuyo espectro de acciones se verán con posterioridad (369, 373).

Hoy sabemos que la actividad biológica de estas sustancias no está restringida a la ejercida sobre las células del sistema inmune, sino que también puede modular el funcionalismo de las pertenecientes a otros tejidos y sistemas (374). Asimismo, la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos y células accesorias está regulada por la acción de diferentes factores solubles, tales como neuropéptidos, hormonas, y otros que pueden no ser secretados por elementos celulares del propio sistema inmune (375).

...la activación

La activación linfocitaria es un proceso no exento de complejidad. La mayor parte de los linfocitos T y B presentes en un momento concreto en el organismo se encuentran funcionalmente en reposo, es decir, están en la fase G₀ del ciclo celular. Cuando un antígeno que se ha expuesto al sistema inmune es procesado por las células accesorias, aparecen en la superficie de éstas

conjuntamente, el antígeno procesado y las moléculas del HLA clase II. El complejo es reconocido por los linfocitos T cooperadores. Simultáneamente el macrófago secreta al medio IL-1, que interacciona con su receptor situado en la membrana de los linfocitos T. La adición de ambas señales sobre este linfocito T cooperador, el reconocimiento específico del antígeno en la superficie del macrófago y la acción de la IL-1, determinan su activación pasando de la fase G_0 del ciclo celular a la G_{1a} . De esta forma, los linfocitos T cooperadores tras haberse activado específicamente comienzan sintetizar y secretar al medio diferentes linfocinas tales como IL-2, BCGF, BCDF o Interferón. Transcurrido un intervalo de tiempo aparecen receptores para la IL-2 en la superficie celular de los linfocitos T citotóxicos. La IL-2 secretada al medio por los linfocitos T cooperadores interacciona entonces con su receptor, se internaliza en las células e induce la progresión de los linfocitos T citotóxicos en el ciclo celular de G_{1a} a G_{1b} , continuando la síntesis de RNA y proteínas y pasando a continuación a las fases de síntesis de DNA, G_2 , hasta entrar finalmente en mitosis (369).

La unión de IL-2 a su receptor posee las características de un sistema hormonal, es decir, es específica para el ligando, es saturable y es reversible.

Hemos señalado cómo sucede la activación de los linfocitos T. Los linfocitos B siguen patrones similares para el mismo proceso, de tal manera que linfocinas como el BCGF y BCDF regulan la proliferación y diferenciación de las células B hacia células secretoras de inmunoglobulinas.

Se deduce de lo explicado el papel clave en el sistema de los linfocitos T cooperadores y de la IL-2.

...el despliegue

Los linfocitos T activados también secretan otros factores de importancia en la respuesta inmune. Producen "Factor estimulador de las colonias

hemopoyéticas". Este factor moviliza de la médula ósea precursores de granulocitos, macrófagos, eosinófilos y mastocitos, a la vez que aumenta su capacidad funcional. Así fenómenos inmunitarios específicos son seguidos de una cascada de eventos no específicos que se convierten en los efectores finales de los fenómenos defensivos. Esta forma de unión entre funciones específicas e inespecíficas de la respuesta inmune es una forma de despliegue del mensaje inmunológico.

El otro camino para el despliegue se fundamenta en la alta movilidad linfocitaria. Una vez que una célula B o T ha sido activada, una proporción de su progenie retorna a formas de pequeño tamaño, indicando que su división ha parado. Ha entrado en el estadio G_0 del ciclo de crecimiento celular. Estas células dejan la médula ósea, el bazo y otros órganos linfoides y pasan a formar parte del conjunto de linfocitos circulantes. Desde la circulación, entran y patrullan por los tejidos o, eventualmente, reingresan de forma temporal en nódulos linfáticos. Un linfocito con memoria puede ejercer esta labor de vigilancia recirculando continuamente, durante varios meses. De forma que si ocurre una reinfección a través de un punto de entrada distante de la infección previa, linfocitos con memoria inmune migrados reaccionarán pronto contra ella.

...la regulación

La regulación del sistema inmune se efectúa utilizando distintos mecanismos. Primeramente, los propios antígenos regulan por sí mismos el sistema defensivo del huésped. Inicialmente las respuestas son policlonales, pero después de repetida y prolongada inmunización, sólo los inmunocitos con alta afinidad serán los encargados de eliminar a los antígenos, pudiendo permanecer pocos clones de linfocitos con memoria.

Los anticuerpos disponen de un mecanismo de retroalimentación, según el cual, la formación de complejos solubles de antígeno-anticuerpo puede regular a la baja la formación de nuevos anticuerpos (365).

Las células T disponen de un sistema de regulación fundamentado en la diferenciación de sus formas activas hacia T citotóxicos, cuando se requiere la eliminación del antígeno, o hacia T supresores si es lo contrario lo que interesa.

Por último, existe un mecanismo compensador entre la inmunidad humoral y la celular, de forma que las carencias de uno de los brazos son compensadas por una hiperfunción del otro. Es conocido el hallazgo de que ratones atímicos (Nude mice) y carentes por tanto de linfocitos T, tienen un aumento de linfocitos B y un incremento compensatorio de la actividad NK. De este modo, dichos animales rechazan con facilidad los heterotrasplantes (376).

A modo de resumen de los conceptos expuestos, se señala, de forma esquemática, lo que sucede en los compartimentos humoral y celular del sistema inmune cuando entran en contacto con un antígeno extraño. Figura 1.

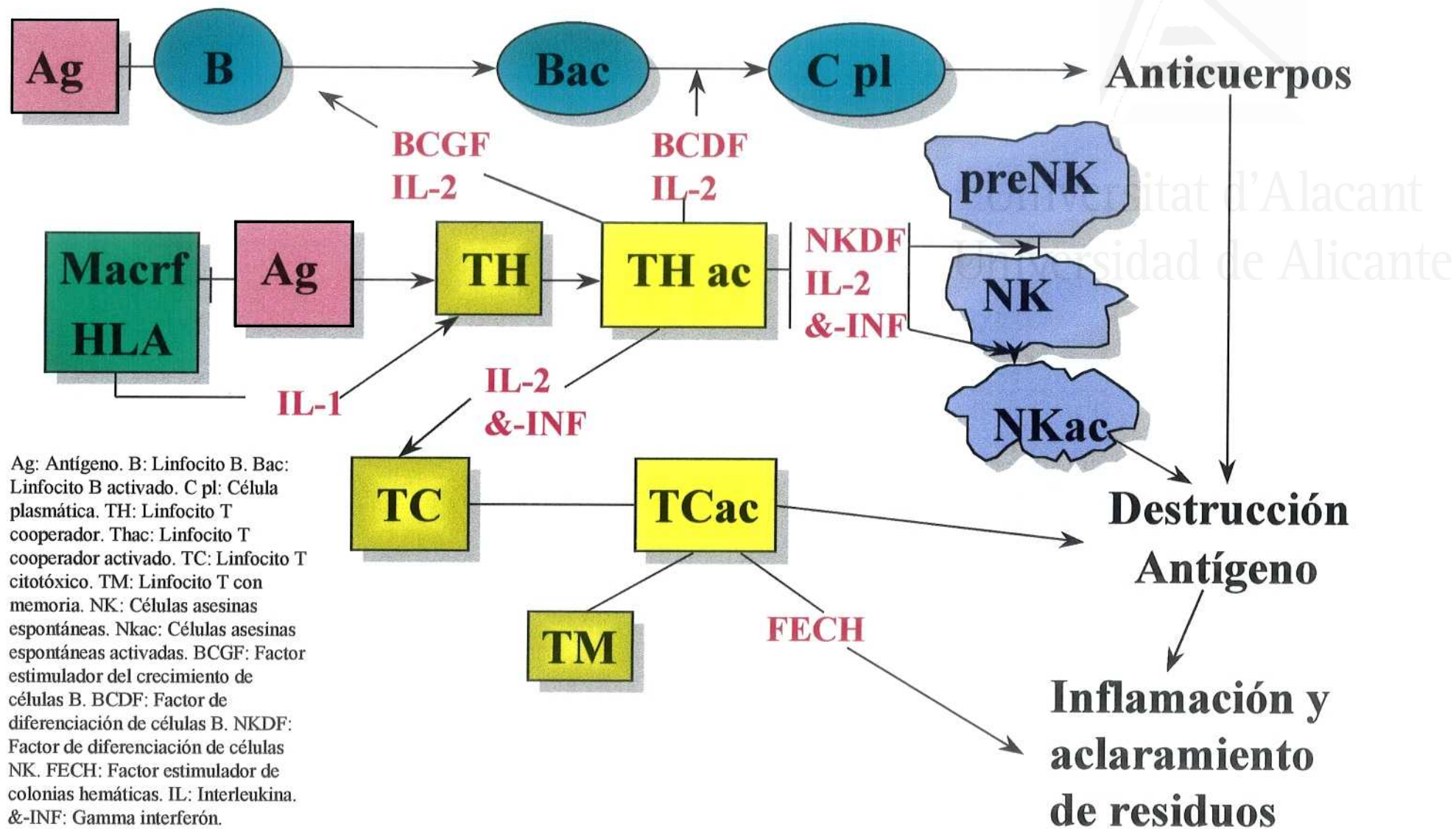


Figura 1. Representación esquemática de la regulación inmune.

Alteración de la inmunidad celular en la endometriosis

Starseva, como hemos mencionado al hablar de la historia de la enfermedad, describió por primera vez la existencia de una disminución de la inmunidad ligada a las células T, conjuntamente con un aumento de la reactividad para las células B en mujeres con endometriosis (58).

Un año más tarde, se comprobó en monos rhesus con endometriosis espontánea una disminución *in vitro* de la proliferación linfocítica en respuesta a antígenos endometriales autólogos. También se demostró una disminución *in vivo* de la reactividad a la inyección intradérmica de antígenos endometriales autólogos en monos con endometriosis espontánea frente a animales sin la enfermedad (377).

El mismo grupo, en mujeres con la enfermedad, encontró una disminución de la citotoxicidad mediada por linfocitos T contra componentes endometriales autólogos, que alcanzó el significado estadístico cuando se comparó con controles sanos ($p < 0.01$). Al analizar los resultados según la severidad clínica de la endometriosis, las alteraciones inmunológicas fueron todavía más llamativas, encontrándose las mayores deficiencias de estimulación linfocítica en pacientes con estadios avanzados (378).

Gleicher y Dmowski determinaron el número de poblaciones linfocitarias periféricas en 31 mujeres con endometriosis y 22 controles. No hubo diferencias estadísticas entre los anticuerpos monoclonales inmunofluorescentes utilizados para marcar las poblaciones linfocitarias. Concluyeron que la deficiencia inmunitaria celular no se correlacionaba con diferencias numéricas en las subpoblaciones linfocitarias, siendo probablemente un defecto cualitativo el que condicionaba la disminución funcional absoluta (379).

Aunque los resultados previos fueron ratificados por otros trabajos

(59, 380), también hubo hallazgos contradictorios en estudios bien diseñados. Así, Badawy y cols. (381) demuestran un incremento en el número de células T y B en fluido peritoneal y sangre periférica de pacientes con endometriosis, comparados con controles sanos.

En los últimos años las investigaciones se han centrado en el ambiente peritoneal. Con relación a la inmunidad celular, los hallazgos han sido uniformes en este compartimento, describiéndose un aumento de linfocitos T cooperadores (T4) y una disminución de linfocitos T citotóxicos (T8) (7, 380-383). Las alteraciones numéricas en las subpoblaciones linfocitarias celulares del fluido peritoneal se complementan con la reciente observación de una disminución en los marcadores de activación de los linfocitos T, en dicho compartimento (384). Significaría ésto que las mujeres con endometriosis presentan en su líquido peritoneal un aumento en el número de células T cooperadoras, una disminución de células T citotóxicas y una disminución de la activación global de los linfocitos T.

Modificaciones en la inmunidad humoral

Simultáneamente con la publicación de Starseva, Weed y Arquembourg (168) propusieron la hipótesis de que la endometriosis causaba una reacción autoinmune capaz de provocar esterilidad. Se basaron para ello en el hallazgo de depósitos de fracción 3 del complemento en el endometrio de mujeres con endometriosis, frente a su ausencia en mujeres sin la enfermedad. Además, encontraron que el complemento sérico total se encontraba reducido en pacientes con endometriosis y que retornaba a la normalidad después de que los focos eran extirpados quirúrgicamente.

El complemento, denominado así por Paul Ehrlich, es un complejo de proteínas interactuantes que reaccionan con las inmunoglobulinas para completar la respuesta inmune. La secuencia clásica envuelve una cascada de 11

proteínas que se activan por una respuesta Antígeno-anticuerpo. Un camino alternativo es el de la Properdina. Esta vía se activa por polisacáridos o endotoxinas, sin activación de inmunoglobulinas. En cada respuesta, la fracción 3 (C3) del complemento se deposita sobre las células diana, destruyéndolas o alterando su función.

Weed y Arquembourg argumentaron que determinadas proteínas liberadas de los focos endometriósicos podían ser reconocidas por el huesped como extrañas y crear una respuesta autoinmune. El grado de respuesta del huesped sería variable, con extensa fibrosis en algunas mujeres y mínima en otras. Esto podría explicar por qué algunas mujeres con respuesta autoinmune débil serían capaces de concebir espontáneamente. También explicaría cómo la supresión ovárica, aún no actuando sobre el sistema inmune, pudiera inactivarlo temporalmente al disminuir la producción de antígenos vía atrofia de los implantes (168). El trabajo de estos autores fue pionero. En el desarrollo de su exposición concibieron la autoinmunidad en la endometriosis como una consecuencia y no como un fenómeno primario. Sus hallazgos han sido, con el paso del tiempo, fuertemente criticados (385). Sin embargo, la autoinmunidad es un fenómeno bien reconocido y aceptado en esta enfermedad.

Infinidad de trabajos comprobaron la presencia, casi constante, de anticuerpos antiendometriales en sangre y fluido peritoneal de pacientes con endometriosis (105, 225, 227, 228, 386, 387). Solamente un trabajo no pudo comprobar la presencia de inmunoreactividad antiendometrial en suero de pacientes con la enfermedad (234). La presencia de anticuerpos antiendometriales fue más frecuente en suero que en líquido peritoneal (236). En endometriosis leve, Halme y Mathur, no pudieron encontrar diferencias significativas con los controles en cuanto a la presencia de anticuerpos antiendometriales en fluido peritoneal (388). Posiblemente los anticuerpos del fluido peritoneal se encuentren formando complejos, al estar en contacto con niveles más altos de antígenos endometriales, y así su detección sea más inconstante. No hubo correlación entre la titulación de anticuerpos antiendometriales y la severidad de la enfermedad (228, 229, 236).

Al investigar el depósito de autoanticuerpos en fragmentos de endometrio, pudo comprobarse que era el componente epitelial la diana de dichos autoanticuerpos, no existiendo fijación en el componente estromal del endometrio normal (229, 289). Antígenos endometriales con peso molecular de 34, 46, 64, 94 y 120 kilodaltons, especialmente 64 kilodaltons, parecen ser los inmunógenos específicos para la autoinmunidad endometrial en todas las pacientes con endometriosis (3).

Las inmunoglobulinas detectadas, tanto en suero como en tejidos endometrial y endometriósico de pacientes con la enfermedad, fueron mayoritariamente IgG (231, 232, 233).

Günter y Tauber, estudiaron las variaciones cíclicas de las inmunoglobulinas depositadas en los tejidos endometrial y endometriósico (390). Encontraron que, en tejido endometriósico, las concentraciones de IgG fueron las más altas, siendo las de IgA 20 veces menores que las primeras y las de IgM prácticamente inexistentes. Todas las inmunoglobulinas disminuyeron durante la fase proliferativa, aumentaron en la fase preovulatoria ($p < 0.05$) y disminuyeron, de nuevo, en la fase secretora. En el endometrio las titulaciones globales fueron menores, pero mostraron el mismo patrón cíclico.

Los anticuerpos antiendometriales y otros como los antiováricos (225) o los antiendotelio vascular (391) constituyen la autoinmunidad denominada organoespecífica. Pero en la endometriosis también se han detectado autoanticuerpos dirigidos contra elementos subcelulares (antinucleares, antimitocondriales, etc...) o contra sustancias químicas propias de la estructura celular (antiDNA, anticardiopina, antianhidrasa carbónica, etc...). Todo ello constituye la autoinmunidad organoinespecífica (104, 392, 393, 394)

Estas observaciones sugieren que la endometriosis está asociada a una activación policlonal anormal de las células B, una característica clásica de las enfermedades autoinmunes.

Células citotóxicas espontáneas (NK) y endometriosis

El papel de estas células in vivo consiste en la defensa frente a infecciones virales. Se ha documentado su efecto citotóxico espontáneo frente a una gran variedad de células autólogas o alogénicas. De forma que se han constituido en el mecanismo de defensa natural más importante frente a las neoformaciones tumorales. Es muy tentador especular que estas mismas células sean las principalmente encargadas de la defensa frente al crecimiento de células endometriales en sitios ectópicos.

Oosterlynck y cols. (60) demostraron que el efecto citotóxico sobre células endometriales autólogas disminuyó de forma significativa en mujeres con endometriosis, cuando las células NK fueron extraídas de sangre periférica utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Sobre células diana heterólogas sensibles a las células NK, estos autores demostraron una disminución de la función de dichas células menor, pero todavía existente, que se correlacionaba con la severidad de la enfermedad. Con posterioridad, el mismo grupo comunicó que en pacientes con endometriosis había una disminución de 2.4 veces en la actividad NK del líquido peritoneal. Esta disminución fue además significativamente mayor en fase folicular que en la postovulatoria, lo que pudiera tener importantes repercusiones fisiopatológicas. Es conocido el hecho de que, en el líquido peritoneal, hay más células endometriales en la fase folicular, haya o no endometriosis. De este modo, la implantación de dichas células en la cavidad peritoneal es más probable en la fase folicular, puesto que luego su viabilidad disminuye progresivamente. Resultaría así que la primera línea defensiva es más deficiente en el momento en que más se necesita su eficacia (395). De igual modo, comprobaron que el defecto, tanto en sangre periférica como en fluido peritoneal, era cualitativo más que cuantitativo (396). Estos autores opinan que el defecto señalado se trata de un evento primario y no de una consecuencia del desarrollo de la enfermedad. Para pensar de este modo, se basan en que la excisión de las lesiones mediante laser no provocó un aumento de la citotoxicidad de NK. Aunque también parecen reconocer que la disminución

de la citotoxicidad de las células NK podría reflejar un aumento de la resistencia de las células endometriales autólogas, más que un defecto primario de las NK.

Los mismos hallazgos se repitieron en otros estudios (397). Pero las críticas hacia las posiciones defendidas por el grupo belga no se hicieron esperar. Hill, señaló la gran variabilidad existente en la actividad NK entre individuos con y sin endometriosis. El hecho, comprobado en adultos normales, de que hay altos, medios y bajos respondedores en cuanto a la actividad NK complica mucho cualquier tipo de especulación en este aspecto (398). El estrés puede influenciar la función NK. El propio grupo belga manifestó que en pacientes con endometriosis, hasta el 37% de la varianza en la actividad NK pudo explicarse por el estilo de vida (8).

Las publicaciones más recientes parecen coincidir en que el defecto de las células NK pudiera ser causado por factores solubles, contenidos tanto en suero como en líquido peritoneal de las mujeres afectas (399, 400, 401).

Macrófagos peritoneales

Los productos de secreción propios de los monocitos y macrófagos pueden estimular o suprimir actividades de otras células inmunes, de modo que juegan un papel que trasciende a sus acciones propias, viéndose implicados los brazos humoral y celular de la respuesta inmune. Los monocitos periféricos son el origen principal de los macrófagos peritoneales y cada uno de estos tipos celulares puede ser afectado en las mujeres con endometriosis.

El dato más concordante en la literatura, con relación a la inmunología de la endometriosis, es el incremento en el número, concentración y grado de activación de los macrófagos peritoneales (402-405). Se trata de células grandes que presentan un aumento en la fagocitosis, incremento en la

secreción de citocinas, prostaglandinas, factores de crecimiento y otros productos proteicos (402).

Para verificar el estado de activación de los macrófagos peritoneales de las mujeres con endometriosis, Braum evaluó la actividad citotóxica de dichos macrófagos, obtenidos del líquido peritoneal de mujeres sometidas a laparoscopia, sobre un cultivo de línea celular de hepatoma. La citotoxicidad fue mayor en mujeres con endometriosis que en controles fértiles sin la enfermedad, pero sorprendentemente, en pacientes con estadios severos disminuyó en relación a las que tenían estadios precoces. Esta disminución de la citotoxicidad pudo ser revertida *in vitro* por Indometacina, lo que sugiere un origen prostaglandínico (404). Posteriores trabajos confirmaron los resultados de Braum, revelando diferencias en la capacidad funcional de estas células según la severidad de la enfermedad (406).

Parecería útil el aumento de la activación macrofágica para provocar la destrucción endometrial en los lugares ectópicos, pero, paradójicamente, esta situación podría interferir con gametos y embriones, contribuyendo a la esterilidad asociada a endometriosis (403, 407).

Las especulaciones más recientes en relación al papel del complejo monocito/macrófago en la endometriosis, se centran en la acción que pudieran tener los múltiples productos secretados por ellos sobre las propias células endometriósicas. En un trabajo (408), los macrófagos obtenidos de líquido peritoneal de 33 mujeres con y sin endometriosis fueron estudiados *in vitro* en cuanto a sus efectos sobre una línea celular de carcinoma endometrial (ECC-1). En 6 de 6 mujeres con estadios III/IV se demostró un efecto mitogénico, que fue bloqueado por un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Sin embargo, en 7 de 9 mujeres con estadio I/II, y en 14 de 18 mujeres sin endometriosis, no hubo efecto mitogénico. Los autores concluyeron que los macrófagos peritoneales podían jugar un importante papel en la progresión de la endometriosis; estando sus efectos probablemente mediados por el factor de crecimiento epidérmico o por otros factores que actuasen sobre dicho

receptor.

Dmowski comprobó que, en pacientes fértiles sin endometriosis, monocitos y macrófagos suprimían la proliferación endometrial *in vitro*. En mujeres con endometriosis, los monocitos estimularon y los macrófagos suprimieron la proliferación endometrial. Además, los efectos citotóxicos de los macrófagos se correlacionaron inversamente con el estadio de la enfermedad (409).

Citocinas y endometriosis

La atención de la mayoría de los grupos que trabajan en la inmunología de la endometriosis se ha dirigido en los últimos años al estudio de las llamadas moléculas de transmisión. Son moléculas secretadas por células, que transmiten mensajes de ejecución a otras células.

Acerca de las citocinas, las observaciones comunicadas son todavía confusas y sólo permiten obtener conclusiones muy especulativas.

La misión mas importante de la IL-6 es promover la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos. En algunas enfermedades autoinmunes IL-6 produce una estimulación policlonal de las células B. Por lo tanto, esta interleukina podría contribuir al desarrollo de anticuerpos en pacientes con endometriosis.

Rier y cols. (410) realizaron un estudio con el objetivo de investigar la capacidad de los leucocitos peritoneales para producir IL-6 *in vitro*, y determinar si la sustancia está presente en el líquido peritoneal *in vivo*. Tomaron líquido peritoneal de 24 mujeres a las que se había sometido a laparoscopia por adherencias postenfermedad inflamatoria pélvica (n=6), ligadura tubárica (n=6), endometriosis leve (n=6) y endometriosis moderada o severa (n=6). Los

leucocitos peritoneales de las pacientes que sirvieron como control (ligadura tubárica) y los de mujeres con endometriosis severa produjeron espontáneamente bajos niveles de IL-6. Por contra, las mujeres con endometriosis leve o adherencias postenfermedad inflamatoria pélvica secretaron espontáneamente niveles 2 a 4 veces superiores de IL-6. Además, las pacientes con endometriosis, tanto leve como severa, fueron refractarias a segregar más IL-6 tras el estímulo de sus leucocitos con endotoxina. Estos datos demuestran que, aunque IL-6 está presente en el fluido peritoneal de todas las pacientes, la capacidad de los leucocitos para producir IL-6 in vitro es diferente de acuerdo al estadio de la enfermedad.

Los hallazgos de Rier fueron confirmados por Ueki (184), quién encontró en líquido peritoneal de pacientes estériles con endometriosis niveles de IL-6 más altos que en controles sanos. También se encontraron niveles más altos de IL-6 en el suero de pacientes con la enfermedad (185). Sin embargo, Keenan y cols. (63) no pudieron encontrar diferencias significativas en los niveles de IL-6 en líquido peritoneal entre pacientes y controles. Lo que sí observaron fue que, en el medio de cultivo de macrófagos obtenidos del fluido peritoneal de pacientes endometriósicas, hubo niveles de IL-6 superiores a los obtenidos en los cultivos macrofágicos de los controles. En concreto, IL-6 fue 4 veces mayor en estadios tempranos y 8 veces mayor en endometriosis avanzadas (63).

Algunos estudios señalan niveles incrementados de IL-1 e IL-2 en el fluido peritoneal de pacientes con endometriosis (184, 185). Pero, de nuevo, Keenan (411), no consiguió encontrar diferencias entre pacientes y controles en los niveles de IL-1 e IL-2 del líquido peritoneal, aunque sí los hubo en el líquido sobrenadante de cultivo de macrófagos.

IL-8 (Interleukina-8), de reciente conocimiento, ha sido implicada en la acumulación de células inflamatorias en diversas patologías. En pacientes con endometriosis, su síntesis podría contribuir a muchos de los síntomas clínicos de esta enfermedad. El grupo de Dmowski demostró que monocitos periféricos de pacientes con endometriosis producían espontáneamente niveles elevados de

IL-8 (412).

Factores de crecimiento y otras moléculas proteicas

Se ha relacionado a numerosas moléculas proteicas con la endometriosis, al ser detectada su presencia en el líquido peritoneal de mujeres con la enfermedad. La mayoría son factores de crecimiento de distinta naturaleza. Algunos ejercen otras funciones. Son producidos por macrófagos o proceden de los focos de endometriosis; bien de células glandulares o, más frecuentemente, de los fibroblastos del estroma endometriósico.

La Fibronectina, además de ser una glicoproteína de anclaje, es un conocido factor de crecimiento para fibroblastos. Los macrófagos alveolares de pacientes con fibrosis pulmonar intersticial la producen en cantidades elevadas. Los macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis produjeron tres veces más fibronectina que los grupos control. Sin embargo, la concentración media de fibronectina en el fluido peritoneal de las pacientes fue un 30% menor que en los grupos control sin la enfermedad. Los autores del trabajo sugirieron que este aumento macrofágico de fibronectina pudiera contribuir a la formación de adherencias, lo mismo que a la implantación de las células endometriales y su crecimiento en la pélvis. Justifican la disminución de la concentración en el líquido peritoneal por su secuestro dentro de los implantes (183).

El mismo grupo encontró que los macrófagos peritoneales produjeron in vitro factor de crecimiento derivado de macrófagos (MDGF) en el 68% de las mujeres con endometriosis y en el 28% de las que tenían anatomía pélvica normal ($p < 0.02$). Así, el hallazgo de que la endometriosis está asociada con un aumento de macrófagos peritoneales in vivo, que producen factor de crecimiento in vitro, puede ayudar a explicar la proliferación o mantenimiento del tejido endometrial en la cavidad peritoneal (413). En concordancia con los hallazgos mencionados se pudo observar que células estromales de la fase

proliferativa tardía, mantenidas en cultivo, proliferaron en mayor proporción cuando se añadió al cultivo líquido peritoneal libre de células de pacientes con endometriosis que cuando el líquido peritoneal era de mujeres sanas. La proliferación celular se valoró por la incorporación a las mismas de Timidina tritiada. Se tuvo la precaución de comprobar que las diferencias en la concentración de estradiol del líquido no eran significativas entre ambos grupos (414).

Ferriam determinó que los lugares de producción del factor de crecimiento fibroblástico eran las células epiteliales, tanto del endometrio como de los tejidos endometriósicos (415).

Otros factores de crecimiento encontrados en elevada cantidad en fluido peritoneal de mujeres con la enfermedad han sido el factor beta de transformación del crecimiento (TGF-B) (187) y el factor de crecimiento epidérmico (416).

La presencia de algunas proteínas en los implantes o el entorno peritoneal tiene un significado poco claro. La urokinasa activadora de plasminógeno, localizada en los vasos endometriales en fase menstrual, se cree que está relacionada con la descomposición tisular de la menstruación. El plasminógeno activado se transforma en plasmina, que es un fermento proteolítico semejante a la tripsina. Su acción básica es la disolución de la fibrina. La presencia constante de esta enzima con altos niveles en el tejido endometriósico supone un hallazgo de difícil interpretación (417).

Aunque la endometriosis no es una enfermedad maligna en el sentido anatómo-patológico del término, comparte algunas características comunes con las enfermedades cancerosas. Tal es la capacidad de invadir tejidos sanos y la de metastatizar a distancia. Determinadas peculiaridades, conocidas en los últimos tiempos, contribuyen a aumentar la similitud entre ambos procesos.

Los denominados protooncogenes son genes que codifican proteínas

que están relacionadas con la proliferación y diferenciación celular. Se denominan así porque son similares a oncogenes virales que inducen crecimiento celular sin restricción. Uno de ellos es el c-myc. Se encontró RNAm y polipéptido c-myc en células glandulares y estromales de endometrio eutópico y ectópico (418).

Muchas proteinasas como la metaloproteinasa III tienen un papel importante en la implantación de células cancerosas. Pues bien, en un estudio japonés se encontraron cantidades significativamente elevadas de metaloproteinasa III en líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, con respecto a mujeres sanas (419).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es un potente factor angiogénico, envuelto en la angiogénesis fisiológica y tumoral. Mc Laren y cols. demostraron un aumento de los niveles de VEGF en el fluido peritoneal de pacientes con endometriosis (420).

Integrinas

Hoy se sabe que el engranaje entre los receptores de cualquier célula y sus respectivos ligandos fisiológicos se efectúa mediante unas moléculas, expresadas en la superficie celular, que se denominan integrinas. Las integrinas o moléculas de adhesión son múltiples. Su expresión no es constante en las células, sino que aparecen en unos momentos y desaparecen en otros, sin que se conozca con exactitud los mecanismos que gobiernan dicho proceso.

Estas proteínas se encuentran implicadas en muchas acciones biológicas como embriogénesis, inmunidad, oncología, etc...(421). En el proceso de la implantación del cigoto parecen tener una importancia especial. Una determinada integrina es producida por el epitelio endometrial a partir del día 19

del ciclo, coincidiendo con la ventana de implantación. En mujeres cuya biopsia endometrial se informó como "fuera de fase", esta integrina se encontraba ausente (366). En pacientes con endometriosis, independientemente de su grado de maduración endometrial, se ha encontrado un defecto en la misma integrina, correlacionándose inversamente el defecto con el grado de extensión de la enfermedad (422). En consecuencia, este trastorno funcional podría estar implicado en la disminución de la receptividad endometrial en las pacientes con endometriosis.

La interacción de los distintos elementos del sistema inmune, así como la de éstos con los elementos extraños, se efectúa con la participación de integrinas. Por lo tanto, estas moléculas están envueltas en el tráfico, activación, señales de transducción y adhesión de elementos del sistema inmunológico. Una expresión inadecuada de tales proteínas en la superficie de macrófagos o células NK pudiera interferir con el mecanismo normal de eliminación de células endometriales depositadas en la cavidad peritoneal vía menstruación retrógrada. Visto al revés, la expresión deficiente de integrinas en las células endometriales refluidas se constituiría en un elemento de resistencia frente a los sistemas encargados de su eliminación.

Recientemente se ha investigado la expresión de moléculas de superficie en monocitos y macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis leve (estadios I y II) o avanzada (estadios III y IV) en comparación con controles fértiles e infértiles. La expresión de algunas integrinas se encontró significativamente disminuida en pacientes con endometriosis leve, frente a controles y endometriosis avanzada (423).

La invasión de los tejidos por las células tumorales se asocia a fenómenos de adhesión entre células neoplásicas y tejidos sanos. Las células metastásicas se implantan en tejidos sanos alejados del tumor primario, utilizando inicialmente moléculas de adhesión. Se puede especular, por analogía, con el concepto de que el endometrio regurgitado a la cavidad peritoneal puede causar endometriosis por el hecho de adherirse a la superficie peritoneal u ovárica (366).

En la "cascada de la adhesión", la cadena beta (VLA B₁), común para todas las integrinas, se combina con distintas cadenas alfa (VLA A_{1,2,3,4,5,6}), formando receptores heterodímeros para laminina, colágeno, fibronectina etc... (424). Estas últimas, son glicoproteínas de anclaje que forman parte de la matriz extracelular peritoneal. Mediante anticuerpos policlonales antilaminina y antifibronectina, Béliard y Donnez (425), localizaron estas glicoproteínas en la membrana basal de los lugares de implantación de focos endometriósicos.

Modulación o manipulación inmunológica

Las células estromales del endometrio rodean a las glándulas y vasos sanguíneos y son importantes reguladores del crecimiento y diferenciación de las células epiteliales. Además, células inflamatorias, a menudo presentes en el estroma, pueden aportar estímulos para cada tipo de células endometriales. Los fibroblastos del estroma endometrial difieren de los de la mayoría de los tejidos, ya que tienen receptores hormonales y, por tanto, responden a los cambios en el ambiente endocrino. Las señales hormonales son integradas junto con mensajes intercelulares, mediados por citocinas y factores de crecimiento, para que, de una forma autocrina o paracrina, se ajuste finalmente el crecimiento y la diferenciación celulares (416).

Es claro que todas estas circunstancias que favorecen el crecimiento del endometrio ectópico, sean las hormonas, los factores de crecimiento, las citocinas u otras no conocidas, no son el elemento de partida en la etiopatogenia de la enfermedad. Son, con toda probabilidad, la consecuencia de que deficiencias del sistema inmune o aumento de la resistencia de las células endometriales desplazadas, conviertan al organismo de algunas mujeres en inmunotolerantes a elementos contra los que deberían ser inmunocompetentes.

Establecer el orden en que se produce cada una de las alteraciones del sistema inmune comunicadas, parecería, en este momento, lo más urgente

para resolver el enigma de la endometriosis. Conocer el origen, genético o exógeno, del desorden inmune nos proporcionaría la posibilidad de desarrollar un tratamiento curativo. Pero con lo que sabemos actualmente comienza a rondar la idea de que la endometriosis puede ser vulnerable a la manipulación inmunológica.

Ya han transcurrido cinco años desde que Gleicher, en un gran artículo (360), recomendase el cambio de rumbo en las investigaciones terapéuticas: "Desde que estudios bien controlados con ensayos terapéuticos prospectivos han sido incapaces de demostrar beneficio permanente de los tratamientos hormonal o quirúrgico sobre la endometriosis, uno debe aceptar que es necesario un nuevo acercamiento terapéutico a la enfermedad. Estudios prospectivos con tratamientos inmunológicos son una urgente necesidad si queremos que la endometriosis pierda su importancia como uno de los contribuyentes mayores de la patología ginecológica".

ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL

Justificación de la endometriosis experimental

La ausencia de aparición espontánea de esta enfermedad en animales, salvo raros casos en primates superiores (426, 427), ha supuesto desde antiguo la necesidad de desarrollar las investigaciones sobre la mujer. Ello comporta importantes inconvenientes éticos y metodológicos, y dificulta la introducción y experimentación de nuevas terapias. Todo se ve condicionado por los siguientes hechos (428):

1. La necesidad de empleo de métodos quirúrgicos para el diagnóstico y caracterización de la enfermedad, así como de su evolución y respuesta al tratamiento, que dificulta el seguimiento cercano, repetitivo y a largo plazo necesario. En este sentido, la laparoscopia ha supuesto un avance extraordinario.
2. La gran variabilidad de la extensión y de las repercusiones de la enfermedad, que impiden la formación de grupos de estudio enteramente comparables y, por lo tanto, hace muy difícil establecer estudios controlados con conclusiones que resulten definitivas.
3. La introducción de nuevos fármacos en la clínica humana está determinada jurídicamente por el seguimiento de una serie de fases en la investigación, que contemplan como paso previo necesario el estudio experimental en animales de laboratorio. Algo indudablemente inexcusable después de las dramáticas experiencias vividas con la Talidomida y otros fármacos.
4. El clima ético-social actual y la propia legislación relativa a los ensayos clínicos hacen muy difícil la realización de estudios controlados en los que un grupo de pacientes (grupo control) resultan aleatoriamente privados del beneficio

que brindan los tratamientos vigentes.

Estas dificultades se pueden soslayar con estudios experimentales, mediante la inducción quirúrgica de endometriosis en animales.

Precedentes históricos

En 1903, buscando un modelo para el estudio de carcinomas, Stilling consiguió crecimiento de fragmentos uterinos y vaginales autotrasplantados en el bazo de conejas (429). Sin embargo, a nuestro juicio el trabajo clave para el posterior desarrollo de modelos experimentales lo proporcionó Cora Hesselberg. Hesselberg era patóloga de la escuela médica de la Universidad de Washington en 1918, cuando publicó su brillante estudio (430). Realizó autotrasplantes (mismo animal) y homotrasplantes (animal distinto de la misma especie) de tejido uterino completo en oreja y pared abdominal de hamsters, y describió, día a día, los hallazgos anatómo-patológicos encontrados, hasta el día 35. Señaló cómo primeramente ambos trasplantes prácticamente se necrosaron y se destruyeron en su mayor parte, pero posteriormente se fueron regenerando y así, al final de la primera semana ya se apreciaba una mejor regeneración del auto que del homotrasplante. A los 35 días, en el lugar del homotrasplante sólo había material hialino con pequeños racimos de linfocitos, pocos vasos y células con pigmentos hemáticos. En el autotrasplante el epitelio formó quistes con papilas, las mitosis eran frecuentes y las glándulas estaban bien preservadas. El tejido conectivo fue mixoide o celular y ocasionalmente presentó mitosis. El músculo se preservó bien en todos los autotrasplantes.

Apoyándose en los trabajos de Hesselberg, Jacobson (431), en 1922, fue el primer investigador que propuso los autotrasplantes de tejido endometrial en animales (conejas) como modelo para el estudio de la endometriosis. Obtuvo crecimiento en cavidad abdominal de implantes practicados con fragmentos de

1 mm de tejido uterino desmenuzado.

Posteriormente, Allen consiguió crecimiento de endometrio trasplantado en la cámara anterior del ojo de conejas (432). Hobbs (433), inyectando tejido endometrial en una vena de la oreja de conejas, observó que dicho tejido llegó al pulmón, donde invadió el parénquima y permaneció viable. De esta manera, demostró experimentalmente la teoría metastásica de la endometriosis invocada por Halban. Por la misma época se comprobó experimentalmente la dependencia estrogénica de los autotrasplantes endometriales en cavidad abdominal de chinchillas (434).

El siguiente hecho importante no se produjo hasta que TeLinde y Scott (43), en 1950, desarrollaron su ya citado modelo experimental en monas para poner a prueba la teoría de la menstruación retrógrada de Sampson. Demostraron, inequívocamente, la viabilidad del tejido endometrial vertido en la cavidad abdominal, adhiriéndose a la teoría de Sampson de la que, hasta entonces, eran detractores.

En 1966, Sensenig y cols. provocaron endometriosis pericárdica en perros (435), y en 1978, Daniel y Williams-Boyle fueron los primeros en sugerir la rata como modelo, por su menor coste y ciclo predecible (436).

Después de los vetustos trabajos enumerados, en la década de los 80 hubo una auténtica explosión de estudios que avanzaron en la caracterización de los diversos modelos experimentales, y analizaron distintos aspectos de la endometriosis inducida. En la década presente han cobrado valor los modelos experimentales para el estudio de los fenómenos inmunológicos en la enfermedad, así como para el ensayo de nuevas modalidades terapéuticas más acordes con los conocimientos actuales. En este sentido, han destacado por sus contribuciones nombres como Schenken y Asch, Vernon y Wilson, Jones, Steinleitner, D'Hooghe y un largo etc...

Conclusiones de los estudios experimentales

El trabajo más importante para la caracterización del modelo experimental en la rata fue el publicado en 1985 por Vernon y Wilson (437). En este trabajo los autores compararon diversos métodos de inducción de la endometriosis y observaron que los implantes presentaban un crecimiento autolimitado, con un máximo hacia los 30-40 días, y estable un mínimo de 10 meses. Confirmaron histológicamente la presencia de glándulas y estroma endometrial en las vesículas, y la producción de prostaglandina F por los implantes en la misma proporción que el endometrio eutópico, lo que interpretaron como prueba de viabilidad de los mismos. Apreciaron la formación de adherencias moderadas y severas en cantidad significativamente mayor en los animales con endometriosis inducida que en los controles, así como reducción de la fertilidad por la presencia de implantes y disminución temporal de estos últimos por la gestación.

Sucesivos trabajos han contribuido a perfeccionar los distintos modelos experimentales, aportando detalles para mejorar la inducción quirúrgica u observaciones no descritas previamente. La rata Sprague-Dawley y la Wistar constituyen modelos bien caracterizados (429, 438, 439, 440). También se dispone de modelos en la coneja (441, 442), el hamster (443), la ratona (444, 445, 446) y la mona en sus formas inducida o espontánea (447, 448, 449).

La hormonodependencia de los implantes ha sido probada por su respuesta ante la castración (450) y ante diversos tratamientos empleados comúnmente en la endometriosis humana (438, 451-461). De igual modo, han sido ensayados tratamientos experimentales como Tamoxifeno (462, 463), Gossypol (464), ácidos grasos poliinsaturados (465), fototerapia (466), agonistas GnRH-Danazol (467), antagonistas de GnRH (316, 368, 369) y antagonistas de la progesterona como Onapristona y Mifepristona (470, 471).

Todos los mecanismos implicados en la fisiopatología de la

esterilidad relacionada con la endometriosis como elevación de las prostaglandinas, folículo luteinizado y no roto, fallo en la implantación, abortos precoces y otros, han sido investigados experimentalmente en conejas, ratas, hamsters y en mayor medida en monas (178, 449, 472-482). Las conclusiones de estos trabajos apoyan la citada relación endometriosis-esterilidad, a excepción de Dunselman y cols. (483, 484).

La reducción de la fertilidad por la presencia de endometriosis experimental ha sido revertida, parcial o totalmente, mediante el tratamiento con Danazol oral o indometacina intraperitoneal (473, 485, 486), y Verapamil o Pentoxifilina periovulatorios (487, 488). Algunos investigadores aluden a la presencia de algún factor en el peritoneo que interfiere con la fertilidad de los animales con endometriosis experimental, sin haber conseguido su identificación (178, 473, 476).

La fulguración diatérmica (489) o el tratamiento con Láser de los implantes (490, 491) también han sido ensayados, así como investigada la formación de adherencias y su prevención (492).

Análisis inmunocitoquímicos, bioquímicos e histológicos de receptores hormonales y secreción proteica de endometrio y lesiones endometriósicas, revelaron varias diferencias entre el endometrio eutópico y el ectópico en monas, conejas y ratas. Estos estudios coinciden en señalar un menor número de receptores hormonales en el endometrio ectópico (493-496).

El efecto sobre la fertilidad, formación de adherencias y creación de endometriosis por instilación intraabdominal de fluido peritoneal, contenido de endometriomas y flujo menstrual, se investigó en hamsters, ratonas y monas. En el Hamster, los fenómenos reproductivos tempranos se vieron suspendidos de forma significativa por la inyección intraabdominal de fluido peritoneal de mujeres con endometriosis mínima o leve (497). No hubo evidencia de formación de adherencias cuando se depositó en la cavidad peritoneal de ratonas el contenido de quistes endometriósicos humanos (498). Se obtuvo una nueva

confirmación de la teoría de Sampson, al observar que las inyecciones intrapélvicas de endometrio menstrual causaron endometriosis en monas (499).

El rendimiento de procedimientos de fluorescencia para el diagnóstico de endometriosis, también fue investigado en modelos experimentales. La fluorescencia de la asociación tamoxifeno-eosina y la del ácido 5-aminolevulínico en lesiones de endometriosis experimentalmente inducidas fue significativamente mayor que la detectada en peritoneo adyacente normal (258, 500).

Por último, se han llevado a cabo interesantísimas investigaciones con trasplante de tejidos endometrial y endometriósico humanos en ratonas atímicas (Nude mice) y en ratonas carentes congénitamente de inmunidad humoral y celular (Scid mice). En ellas, se han estudiado los cambios morfológicos estructurales, el efecto de las hormonas esteroideas y la respuesta a tratamientos como Danazol o Buserelin. De no ser por la fragilidad y los cuidados excepcionales que estos animales precisan y su coste, serían el modelo ideal para el estudio de la endometriosis (376, 501, 502).

En nuestro Departamento existe una larga experiencia con el modelo experimental en la rata Wistar. Brotons (503) ensayó diversos métodos de inducción de la enfermedad, demostrando histológicamente la presencia de endometriosis experimental, y observando mejores resultados con la técnica de Jones. Puso de manifiesto la hormonodependencia por la reducción o desaparición de los implantes tras la castración. Barragán (504) observó una reducción de la fertilidad del 35% respecto al grupo control, así como un aumento del tiempo necesario de apareamiento hasta la presencia de cópula. También apreció que la gestación media (días 10-12) no pareció modificar los implantes, al contrario de lo encontrado por otros autores en monas (505) y ratonas (506). Halló, no obstante, una reducción del tamaño de los implantes del 69% durante la lactancia. Quereda (428) comprobó la disminución del tamaño de los implantes mediante el tratamiento con Gestrinona o Triptorelina, observando un mayor efecto y posibilidad de desaparición macroscópica con esta

última, aunque un efecto quizás más duradero con Gestrinona. De igual modo, demostró que la asociación de Triptorelina y Gestrinona consiguió cifras aceptables de reducción parcial, pero claramente menores de desaparición de los implantes que el tratamiento aislado.

En resumen, de lo expuesto en la literatura y de los hallazgos de nuestro Departamento, puede concluirse que la endometriosis experimental en la rata parece remedar a la humana en su dependencia hormonal, respuesta al tratamiento, influencia negativa sobre la fertilidad, efecto beneficioso de la gestación, etc...Por lo tanto, aparentemente se trata de un buen modelo para la investigación de algunos aspectos desconocidos de la enfermedad y del resultado de nuevas terapias experimentales.

LOS INTERFERONES

Perspectiva inicial

Desde los años 30 se sabía que , en ciertas circunstancias, la multiplicación de un tipo de virus podía ser inhibida por la infección previa de la célula por otro virus. El fenómeno se conocía como "Interferencia viral" (507).

En 1957, un inglés, Alik Isaacs y un becario de la Academia Suiza de Ciencias Médicas, Jean Lindenmann, realizaron el siguiente experimento: Inocularon virus influenza A inactivado por calor en un fragmento de membrana corioalantoidea de embrión de pollo sumergido en un medio de cultivo artificial apropiado. Después de mantener este cultivo inoculado a 37 grados centígrados durante toda la noche, extrajeron el fragmento de membrana corioalantoidea. Luego transfirieron el medio de cultivo a otro recipiente que contenía un nuevo fragmento de membrana corioalantoidea, y mantuvieron este cultivo a 37 grados centígrados durante toda la noche, inoculándolo con virus influenza B no inactivado. No se observó infección viral en el último cultivo. Los investigadores dedujeron que la inoculación con el virus inactivado, y por lo tanto incapaz de multiplicarse, había inducido la producción por las células de la membrana corioalantoidea de un agente que, desde ellas, había pasado al medio de cultivo, donde permanecía disuelto, y que era capaz de interferir la infección por el virus influenza B en un nuevo fragmento de dicha membrana. Este agente, responsable del fenómeno de la interferencia viral, fue denominado por ellos "Interferón" (508).

En su trabajo inicial Isaacs y Lindenmann establecieron algunas de las propiedades básicas de la, por entonces, nueva sustancia. Incubada únicamente con los virus no era capaz de inactivarlos, lo que demostraba que no

actuaba directamente sobre ellos, sino sobre las células a las que ellos infectaban. Apreciaron también que las células necesitaban varias horas de incubación para manifestar interferencia, lo que implicaba que debían ocurrir algunos procesos metabólicos en las células productoras. Ambos hechos ponían de manifiesto diferencias radicales con los anticuerpos. La sustancia era más pequeña que los virus y no era neutralizada por antisuero vírico, por lo que no parecía ser un componente del virus. Más tarde se invocaría su probable naturaleza proteica.

Como hemos visto, originalmente se conoció a la sustancia como el Interferón, creyendo que un solo compuesto era el responsable de la interferencia viral. Sin embargo, los siguientes descubrimientos claramente cambiaron este concepto y crearon otros nuevos.

La primera conclusión vino del trabajo de Tyrrell, quien mostró que Interferón de células de riñón de ternero era inactivo en células de pollo y viceversa. El infirió que Interferón era sólo activo en los tejidos en los cuales se formaba, concibiendo la idea de "especificidad de especie" (509).

Hacia 1960, otros laboratorios, tras el escepticismo inicial, habían confirmado la existencia del sistema del Interferón y los trabajos se concentraron entonces en cuatro áreas mayores. La primera de éstas fue establecer qué era el Interferón. ¿Era una proteína, un ácido nucleico, un carbohidrato?. ¿Tenía alto o bajo peso molecular?. La segunda fue descubrir cómo se produce el Interferón. ¿Ocurría por degradación de algún producto del virus, o actuaba el patógeno previamente sobre algún sistema no reconocido para producir este nuevo producto?. La tercera fue investigar cómo actúa el Interferón. ¿Actuaría contra los virus de forma similar a como actúan los antibióticos sobre las bacterias o, por el contrario, lo haría de forma completamente distinta?. Finalmente, el cuarto propósito mayor fue determinar si esta sustancia podría ser de algún valor en medicina clínica. Responder a las tres primeras cuestiones llevó por lo menos otros veinte años; y la última de las cuestiones todavía sigue abierta (507).

Las actividades antiproliferativa e inmunomoduladora de los

Interferones se pusieron de manifiesto tempranamente. En 1969, Gresser administró dosis elevadas de Interferón a ratones que habían sido inyectados con células cancerosas de origen no viral. Sorprendentemente, no desarrollaron tumores (510). El autor continuó investigando esta acción antitumoral, y su trabajo despertó el interés de la comunidad científica, aumentando la demanda de Interferón.

En investigaciones realizadas en el Instituto Karolinska, en Suecia, Strander utilizó, por primera vez, Interferón en humanos. Trató 44 casos de osteosarcoma. Aunque sus estudios no fueron controlados y los Interferones relativamente impuros, los resultaron parecieron alentadores (511).

A principios de los años 80 se consiguió la obtención del Interferón recombinante, desarrollándose de forma masiva estudios clínicos controlados (512).

Variedades de Interferón

Hasta 1984 los Interferones se clasificaban en dos grupos principales, basados en sus propiedades fisico-químicas y antigénicas. El tipo I incluía al Interferón leucocitario y al fibroblástico, siendo el tipo II el Interferón linfocítico (513). La nomenclatura aceptada actualmente ha sido elaborada por un comité de expertos, y así los tres principales tipos antigénicos son Interferón alfa (INF-alfa), Interferón beta (INF-beta) e Interferón gamma (INF-gamma) (514). En la tabla 8 quedan recogidas las principales características de los tres tipos de Interferón humano.

El sistema del Interferón es la más precoz de las defensas del huésped conocidas. Se ha encontrado en peces y hay evidencia de que mecanismos análogos a los de este sistema pueden ocurrir en plantas, lo que indica un origen remoto (515). Weissmann y cols. (516) han calculado que los

genes para INF-alfa e INF-beta divergieron hace aproximadamente 500 millones de años, mientras que los genes de INF-alfa humano y murino divergieron hace aproximadamente 70 millones de años. En todos los mamíferos están presentes los tres tipos de Interferón.

El INF-alfa lo producen los monocitos periféricos, macrófagos y probablemente los linfocitos B, en respuesta a estímulos virales y antigénicos. Se han descrito más de 25 genes diferentes que codifican para su formación, de los que al menos 15 codifican proteínas potencialmente funcionantes y el resto son pseudogenes. Todos los genes se encuentran estrechamente relacionados y se localizan en el cromosoma 9. Son proteínas no glicosiladas que presentan una escasa especificidad de especie (513). La secuencia de aminoácidos en los alrededor de 30 subtipos conocidos es homóloga en un 85-98%. De estos subtipos, el más importante desde el punto de vista biológico es el INF-alfa 2 (517).

El INF-beta es producido principalmente por los fibroblastos, células epiteliales y macrófagos, en respuesta a estímulos mediados por virus, RNA bicatenario y polirribonucleótidos. Muchos de los inductores del INF-beta lo son también del INF-alfa. Un único gen, localizado en el cromosoma 9 del genoma humano, codifica para su formación. Es una proteína glicosilada con peso molecular entorno a 23.000 Daltons, pero oscilante dependiendo del grado de glicosilación. Presenta una alta especificidad de especie. La secuencia de aminoácidos es homóloga entre el INF-alfa y beta en un 30%, no existiendo homología con la secuencia del INF-gamma (518).

El INF-gamma es también denominado Interferón inmune por sus potentes efectos inmunomoduladores. Es completamente diferente de los otros tipos previamente descritos. Se produce por los linfocitos T activados en cultivos celulares tratados con antígenos o mitógenos, siendo considerado por ello como una linfokina. Sólo se ha codificado un gen para su formación, que se encuentra localizado en el cromosoma 12 del genoma humano. Es una glicoproteína y su peso molecular oscila entre 17-25.000 Daltons, dependiendo del grado de

glucosilación. Una característica altamente diferencial es la de poseer intrones. Estos son secuencias del RNA que no codifican aminoácidos, sino que contienen señales poco conocidas para el empalme del RNA (514).

Hoy se conoce la estructura primaria (composición de aminoácidos y carbohidratos), secundaria (bidimensional) y terciaria (distribución espacial tridimensional) de los tres tipos principales de Interferón (519).

Para ejercer sus efectos reguladores sobre las células es preciso que los Interferones se unan a receptores específicos, los cuales se localizan en la cara externa de la membrana celular plasmática. Se han demostrado dos tipos distintos de receptores, uno común para los Interferones alfa y beta, y otro exclusivo para el INF-gamma. El primero de ellos es una glicoproteína de unos 110-130.000 Daltons. El receptor del INF-gamma es una proteína con un peso molecular de 54.000 Daltons. Todos los receptores se encuentran presentes en la mayoría de las células en número variable (de algunos centenares a pocos millares), aunque la unión de unas pocas moléculas de Interferón por célula es suficiente para inducir actividades específicas (520).

Tras la unión del Interferón al receptor correspondiente, parece que se produce una internalización del complejo receptor-ligando, lo que activaría a una sustancia intercelular, cuya naturaleza es desconocida, que actuaría de segundo mensajero. En el núcleo, este segundo mensajero funcionaría como desrepresor por fijación de un represor de la síntesis de proteínas específicas. Al fijarse el represor, los polipéptidos mediante los cuales ejercen sus acciones los Interferones comienzan a ser sintetizados por la maquinaria celular habitual (521).

Tabla 8. Características de los Interferones humanos.

Característica	INF A	INF B	INF G
Sinónimo	Leucocitario	Fibroblástico	Inmune
Genes	> 25	1	1
Localización de los genes	Cromosoma 9	Cromosoma 9	Cromosoma 12
Subtipos	30	1	1
Estructura molecular	Proteína	Glicoproteína	Glicoproteína
Número de aminoácidos	166	166	146
Estabilidad	Acido estable	Acido estable	Acidolábil
Peso molecular	20.000 D	23.000 D	17-25.000 D
Células de origen	Leucocitos Monocitos Macrófagos	Fibroblastos Cels. epiteliales Macrófagos	Linfocitos T

Síntesis celular y métodos de obtención

Cuando un inductor de la síntesis de Interferón, sea por ejemplo un virus, penetra en una célula diana, la presencia del RNA viral en el citoplasma de la misma, da lugar a la cadena de reacciones celulares que concluyen con la síntesis de la proteína constitutiva de una variedad determinada de Interferón (522).

A nivel del núcleo de la célula diana, el gen activado que contiene la información para la síntesis de la nueva proteína, hace de sustrato para la formación de una cadena complementaria de RNA. El código es, de esta forma, trasferido íntegramente a un RNA mensajero (RNAm) (trascricpción). El RNAm abandona el núcleo y se acopla al sistema ribosomal, sede de la síntesis protéica. Una vez formada la nueva proteína (Interferón), ésta es transferida desde los ribosomas, situados en el retículo endoplásmico rugoso, al sistema cisternal de Golgi, donde se depositan en las vesículas secretoras. Desde este lugar, el Interferón es liberado al espacio extracelular para pasar a otras células o a la circulación sanguínea.

Cantell (523) estudió la capacidad de diversas células humanas para producir Interferón. Descubrió que suspensiones de leucocitos humanos producían unos rendimientos diez veces mayores que los obtenidos con otras células humanas. El método utilizado por Cantell para la producción de Interferón humano consiste en la estimulación por virus Sendai de leucocitos humanos. La producción se recoge y el Interferón secretado es parcialmente purificado con tiocianato potásico, precipitándose posteriormente en un medio ácido. Este Interferón, obtenido por el método de Cantell, posee un 1% de pureza, conteniendo una mezcla de diferentes subtipos de INF-alfa, pequeñas cantidades de INF-beta y factor de necrosis tumoral. Es un método costoso y de bajo rendimiento (523).

El siguiente procedimiento empleado para la producción de

Interferón ha sido la utilización de cultivo de células humanas. Se cultiva en gran escala una línea celular linfoblástica denominada Namalwa. En las células así generadas se induce la formación de Interferones mediante la inoculación del cultivo con virus Sendai. El rendimiento de este método es mayor que el de Cantell, pero aún así sigue presentando problemas de pureza.

El uso de microorganismos, mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética, ha permitido lograr la producción de Interferón humano en grandes cantidades y con un elevado grado de pureza. El primer paso consiste en extraer del DNA del leucocito humano el gen que codifica para un determinado Interferón. La célula que se emplea como fábrica generalmente es una cepa no patógena de E. Coli. La célula bacteriana contiene un filamento de DNA llamado plásmido, responsable de la síntesis de proteínas. El plásmido se extrae de la célula bacteriana, y abriéndose por medio de una enzima, se inserta el DNA para Interferón humano en el DNA bacteriano. A continuación se vuelve a cerrar empleando otra enzima. El plásmido contiene ahora lo que se denomina DNA recombinante, es decir, una combinación de DNA humano y bacteriano. Éste se inserta en la célula bacteriana y a medida que ésta se reproduce, transmite el DNA recombinante a cada una de las bacterias resultantes, que naturalmente producirán Interferón.

Posteriormente, se realiza un proceso complejo de purificación mediante extracción en medio ácido y procedimientos cromatográficos con diversos disolventes. En último lugar, se logra la cristalización a partir de soluciones concentradas por evaporación-liofilización. Se consiguen de este modo grandes cantidades de la sustancia con una pureza del 98% (524).

Acciones biológicas y mecanismos de actuación

Las acciones biológicas de los Interferones pueden agruparse en:

- * Actividad antiviral.
- * Actividad antitumoral
- * Actividad inmunomoduladora.

Probablemente son comunes muchos de los mecanismos por los que se ejercen unas y otras acciones. Además existe una clara interrelación entre ellas, de forma que algunas acciones contribuyen a la potenciación de las otras. Por ejemplo, la actividad inmunomoduladora contribuye a los efectos antitumoral y antiviral.

Actividad antiviral

Esta actividad no es directa contra los virus, sino mediada a través de sus efectos sobre la célula receptora sana o célula diana. Los mecanismos fundamentales de la acción antivírica se basan en la inhibición de la síntesis proteica viral en el seno de la célula huésped. Los Interferones tras interactuar con la célula en la forma en que se señaló previamente, desencadenan la síntesis de una serie de proteínas entre las que se encuentran (518):

2'5' OLIGO-ADENILATO-SINTETASA (OAS). Esta enzima convierte el ATP en 2'5' Oligoadenilato, que activa una endonucleasa capaz de provocar la degradación del RNAm y así inhibe la síntesis proteica viral. Efectivamente, la 2'5' OAS, tanto en células normales como neoplásicas, parece capaz de inhibir la síntesis proteica, pudiendo estar relacionada con las acciones antiproliferativas

y antivirales.

PROTEINFOSFOQUINASA. Esta enzima fosforila las histonas H3 y H4, proteínas indispensables para el inicio de la síntesis proteica viral.

FOSFODIESTERASA. La cual, actuando sobre el RNAt viral, inhibe el proceso de desarrollo de las cadenas protéicas completas que el virus va a producir, ya que bloquea la incorporación de aminoácidos al sistema ribosomal.

Pero además, los Interferones pueden aumentar la resistencia frente a determinados agentes virales por mecanismos desconocidos no relacionados con la síntesis proteica. Se ha comprobado que pueden dificultar el ensamblaje intracelular de estructuras víricas, impidiendo la formación de viriones completos. En otros casos, inhiben la liberación al medio extracelular del agente vírico, o bien, las partículas víricas excretadas carecen de infectividad (525).

Por otra parte, los Interferones también pueden ejercer actividad antiinfecciosa a través de sus efectos inmunomoduladores, entre los que destaca el aumento en la actividad NK, la activación de linfocitos T citotóxicos y la estimulación macrofágica (526).

Actividad antitumoral

Los Interferones poseen la capacidad de inhibir la replicación tanto de células normales como malignas. Esta actividad citostática, habitualmente reversible, se manifiesta por una paralización de su ciclo celular en la fase G₁, y pudiera estar relacionada con la aparición de determinados efectos secundarios (pancitopenia). Todos los tipos de Interferón presentan en mayor o menor grado la capacidad de inhibir la multiplicación celular, tanto experimentalmente como en el ser humano. Se ha comprobado la reducción llamativa de la proliferación de hepatocitos, precursores de eritrocitos, células embrionarias, fibroblastos,

células tumorales y células linfoides (513, 519).

El efecto mitogénico de diversas citocinas como el factor de crecimiento de origen plaquetario, el factor de crecimiento epidérmico o el factor de necrosis tumoral, puede ser contrarrestado por Interferones. Como estas citocinas pueden a su vez inducir la síntesis de Interferón, es posible que éste se encuentre implicado en un mecanismo de feed-back negativo que regule la actividad proliferativa de estos factores (517).

Un efecto antiproliferativo de los Interferones ocurre por bloqueo parcial de la traducción celular, por reducción de la síntesis protéica y por una prolongación del tiempo intermitótico (516).

Otros mecanismos secundarios por los que se puede desencadenar una acción antitumoral son la inducción de receptores hormonales en líneas celulares de tumores hormonosensibles (527, 528), la modulación de la expresión de los antígenos de clase I y II del Sistema Mayor de Histocompatibilidad (518), la inhibición de la expresión de determinados oncogenes (529) y los efectos, ya descritos, sobre el sistema inmune.

Actividad inmunomoduladora

Los Interferones ejercen funciones reguladoras decisivas en el sistema inmune, bien por efecto directo sobre la correspondiente célula diana o indirecto, a través de modificaciones en la secreción de otras citocinas.

Sobre la producción de anticuerpos, se admite que la administración de Interferones previamente al contacto con el antígeno, aumenta la producción de anticuerpos, mientras que si se aplica después del antígeno, suprime la respuesta. Dosis altas inhiben "in vivo" la respuesta de células formadoras de placas, mientras que dosis bajas aumentan la formación de placas (517, 518).

La capacidad citotóxica y fagocítica de las células T son moduladas positivamente por los Interferones, favoreciendo su eficiencia defensiva frente a los elementos extraños (518).

Todas las pruebas efectuadas hasta hoy han demostrado la capacidad de los Interferones para aumentar la actividad NK de las células mononucleares sanguíneas. Producen un incremento de la actividad lítica de los precursores de células NK y aumentan la eficacia de sus elementos maduros. Este efecto modulador no sólo supone una mayor capacidad lítica frente a células sensibles a las células NK en condiciones basales, sino que las amplía frente a otras resistentes (526).

Varios estudios han indicado que el tratamiento de células de exudado peritoneal con Interferón o con inductores de Interferón, puede aumentar su potencial fagocítico (530). Adicionalmente, afectan a la función de los macrófagos al regular la expresión de sus antígenos de superficie del sistema mayor de histocompatibilidad y la producción de Interleukina 1 y factor de necrosis tumoral (531).

Farmacocinética y farmacodinamia

Estudios toxicológicos experimentales

En los estudios realizados para valorar la posible toxicidad por la administración única y repetida de Interferones en ratas, ratones, conejos y monos, por vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular, no se ha puesto de manifiesto algún efecto tóxico digno de mención (532). Se han administrado dosis de hasta 30 millones UI/10 ml/Kg de peso, no observándose signos clínicos ni muertes relacionadas con el fármaco, a excepción de un claro aumento en la temperatura corporal, que es habitual para los Interferones.

Farmacodinámicamente, la administración intravenosa de 1, 2.5 y 5 millones UI/Kg de peso, no indujo en ratas cambios significativos en la presión arterial, la frecuencia cardíaca, el ECG o la actividad respiratoria. Tampoco se manifestaron alteraciones a nivel de los músculos lisos de íleon aislado de cobaya o útero aislado de rata.

Farmacocinéticamente, tras la administración oral a ratas (intubación gástrica), no se detectó actividad en plasma, lo que confirma la alta susceptibilidad de los Interferones a las proteasas gástricas. Por las vías intramuscular y subcutánea se alcanzaron niveles plasmáticos máximos a las 1 y 2 horas respectivamente, siendo superior la concentración plasmática máxima tras la administración subcutánea. La presencia de la sustancia en líquidos intersticiales fue constante, estando ausente en líquido cefalorraquídeo. Se registró un elevado índice de filtración glomerular y reabsorción y catabolismo tubular renal. También hubo catabolismo hepático (533).

Perfil farmacológico en el hombre

Las rutas más frecuentes de administración para los Interferones han sido la intramuscular y la subcutánea. Bajo dichas circunstancias, el fármaco es absorbido desde el sitio de inyección, incrementándose progresivamente los niveles plasmáticos durante las primeras 5-9 horas. Posteriormente los niveles plasmáticos decrecen hasta ser indetectables a las 24 horas de la administración. Ambas, la vía intramuscular y la subcutánea presentan curvas plasmáticas similares, aunque el pico máximo puede estar significativamente retrasado después de la inyección subcutánea (534).

El INF-beta presenta una importante diferencia. Siguiendo a una inyección intramuscular los niveles en sangre de la sustancia son indetectables, a pesar de dar lugar a efectos biológicos. Para explicar este fenómeno se sugirieron dos alternativas. La primera suponía que el fármaco era poco estable

en sangre y se degradaba rápidamente. La segunda, que tuviese una liberación muy lenta desde la zona inoculada. Hoy sabemos que esta sustancia tiene fundamentalmente una absorción linfática, desde donde pasa rápidamente a los tejidos evitando el flujo plasmático, debido a la hidrofobicidad de su glicoproteína (535).

Una remarcable cantidad de INF-alfa es filtrada, reabsorbida y ampliamente degradada en las células tubulares renales con insignificante excreción en la orina. Diferencias en la carga molecular o en la forma son probablemente las responsables de la significativa reducción de la filtración de INF-beta. Su catabolismo es principalmente hepático (536).

Para evaluar las características farmacodinámicas, se ha prestado atención a la presencia de algunos marcadores como la actividad de 2'5'OAS, cuyo nivel máximo se alcanzaba a las 24 horas y permanecía elevado hasta las 96 horas en que alcanzaba el nivel basal (537). Sin embargo, cuando se evalúa el efecto inmunomodulador de los Interferones estos datos tienen poco valor, ya que los efectos biológicos pueden permanecer largo tiempo dependiendo de la vida de las células moduladas (534).

Experiencia clínica

El desarrollo clínico de los Interferones ha progresado a través de estudios iniciales de fase I hasta estudios de fase III con extensos ensayos clínicos controlados. Son el prototipo de un grupo de agentes biológicos que están en plena expansión. Estos agentes operan, como hemos visto, a través de mecanismos de acción diferentes a los quimioterápicos convencionales y producen un perfil de efectos secundarios así como de patrones de respuesta distintos.

Ensayos clínicos

En varias enfermedades infecciosas se ha comunicado beneficio con el empleo de Interferones (517, 538):

- * Infección ocular por virus Herpes simple I.
- * Herpes Zoster.
- * Infección respiratoria aguda por Rinovirus.
- * Infección por *Aspergillus Fumigatus*.
- * Lepra lepromatosa.
- * Verrugas vulgares.
- * Condiloma acuminado e infecciones genitales por papilomavirus.
- * Papiloma laríngeo.
- * Hepatitis crónica B y C.
- * Profilaxis de infecciones víricas tras trasplante renal.
- * Infección por Citomegalovirus.

También en un nutrido grupo de enfermedades neoplásicas se ha investigado el efecto antiproliferativo de estas sustancias (517, 538):

- * Tricoleucemia.
- * Leucemia mieloide crónica.
- * Linfoma no Hodgkin.
- * Linfoma cutáneo de células T.
- * Mieloma múltiple.
- * Cáncer Vesical (varios tipos histológicos).
- * Cáncer Renal (Varios tipos histológicos).
- * Cáncer de mama.
- * Cáncer de ovario (varios tipos histológicos).
- * Lesiones preneoplásicas vulvo-vagino-cervicales.
- * Cáncer pancreático.
- * Tumores carcinoides.

- * Algunos tumores cerebrales.
- * Melanoma maligno.
- * Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA.

Algunas enfermedades neurológicas (Esclerosis múltiple) o autoinmunes (Lupus eritematoso sistémico) han sido, de igual modo, objeto de estudio.

No se ha hecho uso clínico todavía de otros importantes efectos fisiológicos de los Interferones, como su capacidad para inducir ondas lentas de sueño cuando se administra intraventricularmente (517).

Efectos adversos

Existe un grupo de efectos secundarios tempranos que se presentan de forma autolimitada tras las primeras inyecciones en la mayoría de los pacientes (539). Estos son: Fiebre, mialgias, cefalea, astenia, anorexia.

Otro grupo de efectos secundarios tardíos pueden persistir durante todo el tratamiento. Generalmente con dosis bajas o medias están ausentes. Algunas veces obligan a disminuir las dosis o a suspender el tratamiento (539). Según el sistema orgánico afectado serían:

Sistémicos.- Pérdida de peso y caída del cabello.

Hematológicos.- Neutropenia y trombopenia.

Gastrointestinales.- Diarrea y vómitos.

Inmunológicos.- Aumento de infecciones bacterianas, tiroiditis autoinmune, vasculitis.

Psiquiátricos.- Irritabilidad, depresión, somnolencia/insomnio, cuadros confusionales, cuadros psicóticos.

Cardiovasculares.- Hipotensión y taquicardia.

En un análisis que incluyó 867 pacientes tratados con INF-alfa durante ensayos clínicos en fases I,II y III, los efectos secundarios más frecuentemente aparecidos fueron los siguientes: Fiebre 98%, nauseas 46%, alteraciones neurológicas 34%, vómitos 29%, diarrea y otras alteraciones gastrointestinales 27%, alteraciones cardiovasculares 14%. Otras alteraciones incidieron en menos del 10% de los sujetos tratados (540).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

HIPOTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO

HIPOTESIS

De lo expuesto en las páginas anteriores pueden establecerse una serie de razonamientos en los que se apoya el enunciado de la hipótesis que dió origen a esta investigación. Dichos argumentos son los siguientes:

1. En las pacientes con endometriosis existen alteraciones inmunológicas que, independientemente de que sean causa o consecuencia de la enfermedad, juegan un papel trascendente en la patogenia de la misma.
2. La endometriosis experimentalmente inducida en la rata Wistar remeda a la endometriosis espontánea humana en muchos aspectos y constituye un buen modelo para la investigación del efecto de terapias experimentales.
3. La inmunomodulación con Interferones ocasiona efectos sobre los distintos componentes del sistema inmune contrarios, en gran medida, a los mayoritariamente observados en las pacientes con endometriosis.
4. Los Interferones exhiben acciones antiproliferativas, habiéndose comprobado un efecto citostático en un gran número de procesos neoplásicos.

Postulo pues, hipotéticamente, que:

LOS INTERFERONES ALFA 2B RECOMBINANTE HUMANO Y BETA HUMANO REDUCEN SIGNIFICATIVAMENTE EL TAMAÑO DE LOS IMPLANTES DE ENDOMETRIO AUTOTRASPLANTADOS EN LA CAVIDAD PERITONEAL DE LA RATA WISTAR.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Objetivo principal: Valorar si los Interferones alfa 2b recombinante humano y beta humano reducen significativamente el tamaño de los implantes de endometrio autotrasplantados en la cavidad peritoneal (endometriosis experimental) de la rata Wistar. Es decir, verificar o desmentir la hipótesis.

Objetivos secundarios:

1. Valorar el efecto de la administración intraperitoneal de INF-alfa 2b recombinante humano, suministrado simultáneamente a la inducción experimental de la endometriosis, sobre los implantes de endometrio autotrasplantados en la rata Wistar.
2. Establecer la vía de administración de INF-alfa 2b recombinante humano más eficaz para reducir la endometriosis experimental en la rata Wistar.
3. Determinar el momento en que se produce el efecto máximo del INF-alfa 2b recombinante humano, a corto plazo, sobre la endometriosis experimental en la rata Wistar, y valorar la evolución de dicho efecto a largo plazo.
4. Determinar la pauta de administración y la dosificación de INF-alfa 2b recombinante humano más eficaces para reducir la endometriosis experimentalmente inducida en la rata Wistar.
5. Establecer qué tipo de Interferón, alfa 2b recombinante humano o beta humano, presenta una reducción mayor del tamaño de los implantes de endometrio autotrasplantados en la cavidad peritoneal de la rata Wistar.

DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Para alcanzar los objetivos propuestos, diseñamos un estudio experimental longitudinal, analítico, controlado, parcialmente aleatorizado y a simple ciego.

El estudio se planificó en cinco fases o experimentos individuales, pero interconexionados, de forma que los resultados del experimento previo condicionaban a los siguientes. Aunque se realizó un protocolo de investigación, recogiendo el conjunto de pasos que se sucederían en el estudio, las dosis, vías de administración y pautas terapéuticas a aplicar en cada experimento se establecieron en base a los resultados de los experimentos previos.

Al tratarse de un estudio inédito, era totalmente imposible el cálculo de un efecto esperado, y por lo mismo, también imposible, la predeterminación del tamaño de la muestra. En trabajos previos de nuestro Departamento, se ensayó, en el mismo modelo experimental y con metodología similar, el efecto de los tratamientos actualmente usados en la clínica. Para establecer el tamaño muestral actual nos basamos en dichos trabajos. Elegimos un número de animales tal, que el no encontrar diferencias entre ellos en el estudio actual hubiera reflejado una clara desventaja respecto a los tratamientos convencionales.

Para determinar el efecto sobre el desarrollo de la endometriosis experimental de Interferón alfa 2b, administrado simultáneamente a la inducción quirúrgica de la enfermedad, diseñamos el experimento 1 (Figura 2). Adicionalmente, mediante éste experimento, dispondríamos de un grupo de control que nos permitiría conocer si la metodología que íbamos a aplicar en toda la investigación podía modificar, por sí misma, el tamaño de los implantes endometriósicos. De este modo, provocaríamos quirúrgicamente endometriosis a 50 ratas. En ese momento dejaríamos en la cavidad peritoneal de 20 animales, aleatoriamente determinados, una dosis estándar de Interferón alfa 2b. Treinta a cuarenta y cinco días más tarde relaparotomizaríamos a los animales para

evaluar, tanto en el grupo tratado ($n=20$) como en el no tratado ($n=30$), el grado de endometriosis conseguida (Laparotomía de estadiaje). En ese momento, las 20 ratas previamente tratadas serían sacrificadas. Llamaremos en adelante a este grupo de animales que recibieron tratamiento en el momento de la inducción de la endometriosis, **grupo B**. En las 30 ratas no tratadas se realizaría, pasados 60 días, una reintervención para valorar el efecto de la laparotomía previa, así como del tiempo transcurrido y de la manipulación de los animales, sobre el tamaño de la endometriosis previamente conocido (Laparotomía de reestadiaje). Con idéntica intención se sometería a los animales a una cuarta y última laparotomía, a los 60 días de la intervención previa, en el transcurso de la cual se sacrificaría a las ratas (Laparotomía de reestadiaje final y sacrificio). Este grupo de animales, portadores de la enfermedad, no sometidos a tratamiento pero manipulados en la misma forma y mantenidos durante el mismo tiempo que los posteriormente tratados, constituirían el grupo de control (**grupo A**).

El experimento 2 se diseñó con el objetivo de valorar el efecto sobre la enfermedad de pautas cortas de Interferón alfa 2b, así como determinar la vía de administración más efectiva en animales con la enfermedad desarrollada. También determinaríamos, mediante éste experimento, el momento en que se produce el efecto máximo del Interferón alfa 2b, a corto plazo, y la evolución de dicho efecto a largo plazo. Se aprecia una representación esquemática del diseño de este experimento en la figura 3. Induciríamos quirúrgicamente endometriosis a 60 animales (Laparotomía de inducción) y el tamaño de la enfermedad conseguida sería determinado mediante una nueva laparotomía 30-45 días más tarde (Laparotomía de estadiaje). En ese momento, los 60 animales sufrirían una doble aleatorización. Primeramente se distribuirían en dos grupos iguales de 30 sujetos. En un grupo se trataría con dosis estándar, en pauta corta de Interferón alfa 2b intraperitoneal. En el otro grupo con dosis estándar, en pauta corta de Interferón alfa 2b subcutáneo. A su vez, en cada grupo previo se formarían aleatoriamente tres subgrupos de 10 animales que se someterían a laparotomía de reestadiaje a los 6, 12 y 20 días de concluido el tratamiento, respectivamente. Finalmente todos los animales, a los 120 días de la laparotomía de estadiaje, pasarían a la laparotomía de reestadiaje final y sacrificio.

Denominaremos **grupo C** a los animales de éste experimento que recibieron Interferón alfa 2b por vía intraperitoneal, y **grupo D** a los que recibieron el fármaco por vía subcutánea.

Conocida por el experimento previo la vía de administración más efectiva con una pauta corta de tratamiento, necesitábamos saber si una pauta terapéutica mantenida (pauta larga) lograba mejorar los resultados anteriores. Así diseñamos el experimento 3 (Figura 4). Quince ratas con endometriosis experimental y estadiadas en forma y tiempo similares a los experimentos previos, serían tratadas con dosis estándar de Interferón alfa 2b, en pauta larga, por la vía que hubiese demostrado ser más eficaz. A estos animales se les realizaría una laparotomía de reestadiaje en el momento en que, según el experimento 2, el Interferón manifestase su máximo efecto sobre el tamaño de los autotrasplantes endometriales. Sesenta días más tarde, se someterían a laparotomía de reestadiaje final y sacrificio para comprobar el efecto a largo plazo de la antedicha pauta terapéutica. Nombraremos en el futuro a estos animales como **grupo E**.

Hasta este momento la única dosis utilizada, aunque con distintas pautas, habría sido la estándar de 400.000 Unidades/Kg (mayoritariamente empleada en ensayos experimentales). Una dosis superior podría conseguir mayor reducción del tamaño de los autotrasplantes de endometrio, o quizás una dosis inferior fuese capaz de ofrecer resultados similares a los conseguidos por dosis más altas. En el experimento 4, treinta ratas con endometriosis inducida y estadiadas en forma similar a los experimentos previos, serían aleatoriamente distribuidas en dos grupos para recibir la mitad de la dosis estándar de Interferón alfa 2b, por la vía y con la pauta más efectivas según los experimentos previos, o el doble. La laparotomía de reestadiaje se realizaría en el momento de máximo efecto, detectado en el experimento 2. La laparotomía de reestadiaje final y sacrificio sucedería a los 60 días de la laparotomía previa (Figura 5). Al conjunto de animales tratados con la mitad de la dosis estándar los llamaremos **grupo F**, y los tratados con el doble de dicha dosis estándar se denominarán **grupo G**.

Determinadas ya la vía de administración, pauta terapéutica y dosis más eficaces, así como el momento del efecto máximo del Interferón alfa 2b recombinante humano, quedaría por conocer el rendimiento del Interferón beta humano en la endometriosis experimental. En el experimento 5 (Figura 6), quince animales con autotrasplante endometrial, estadiados, serían medicados con Interferón beta por la vía más efectiva y con la pauta y dosificación que hubieran presentado más eficacia para el Interferón alfa 2b. Serían reestadiados en el momento en que los experimentos previos hubieran demostrado el efecto máximo. Evaluados finalmente y sacrificados a los 60 días de la laparotomía previa. Identificaremos a éstos animales como **grupo H**.

De este modo, quedarían configurados el grupo de control y los distintos grupos de tratamiento en la forma que se aprecia en la tabla 9.

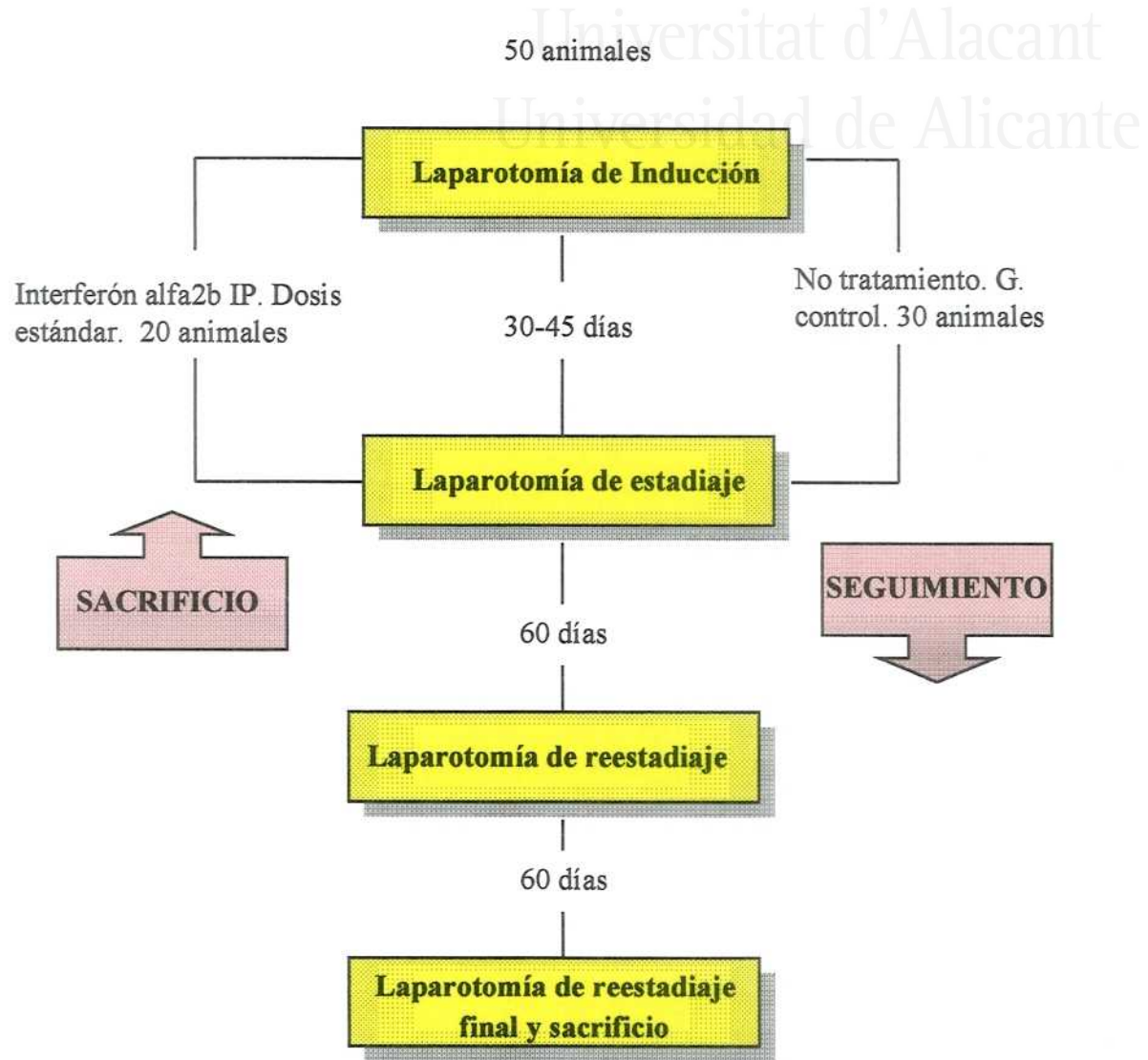


Figura 2. Diseño esquemático del experimento 1.

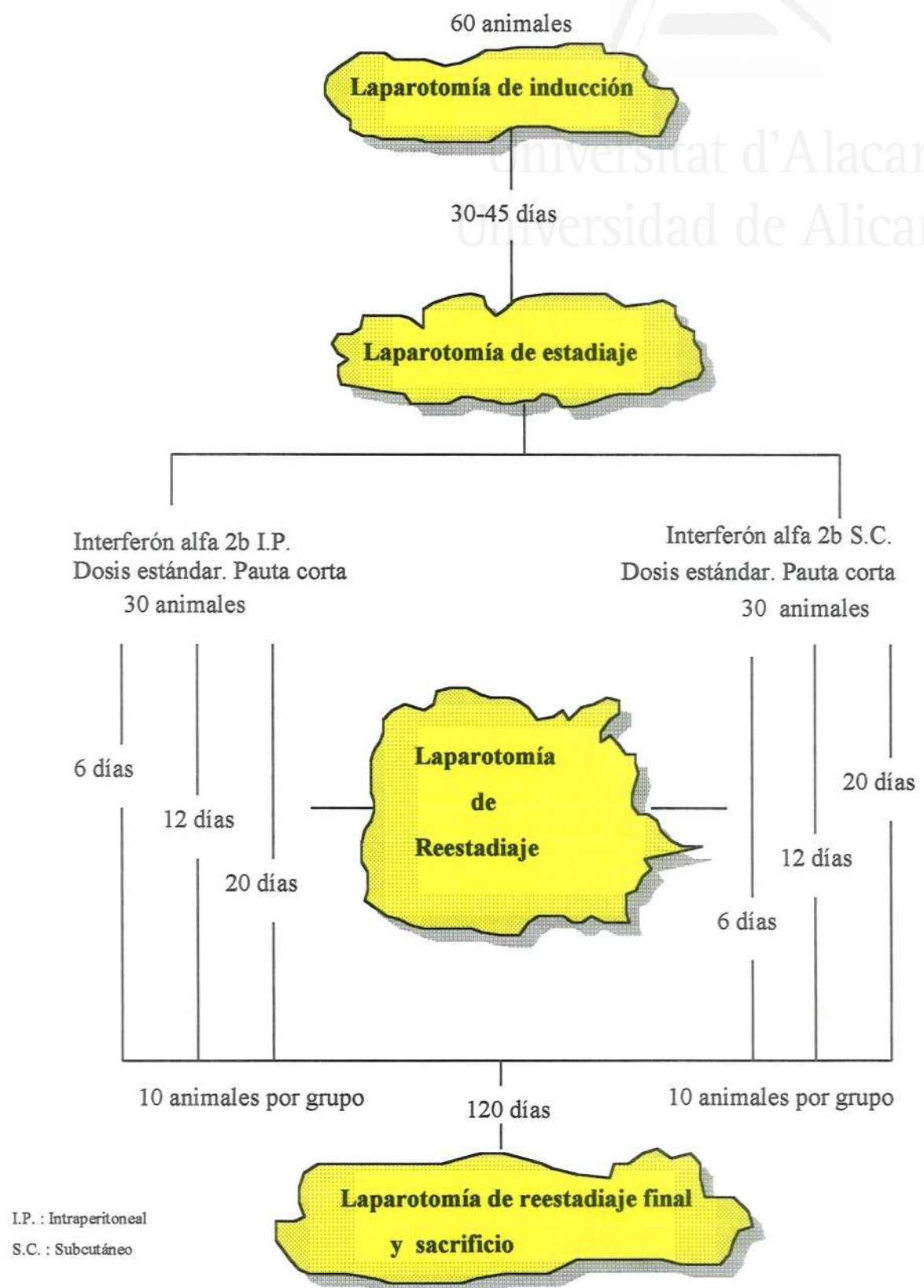


Figura 3. Diseño esquemático del experimento 2.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

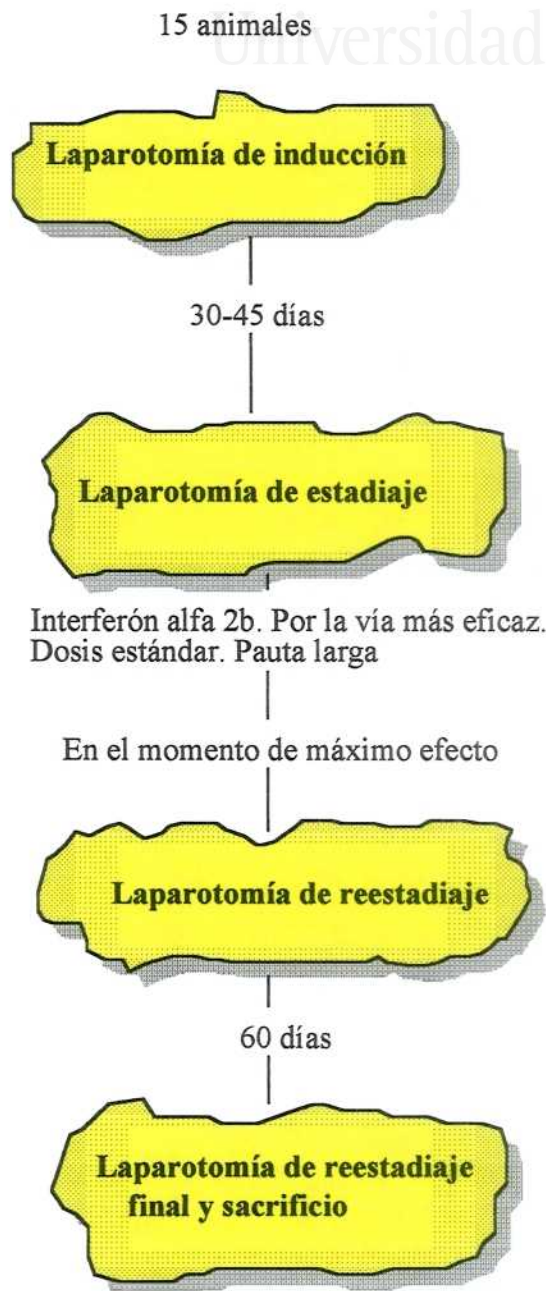


Figura 4. Diseño esquemático del experimento 3.

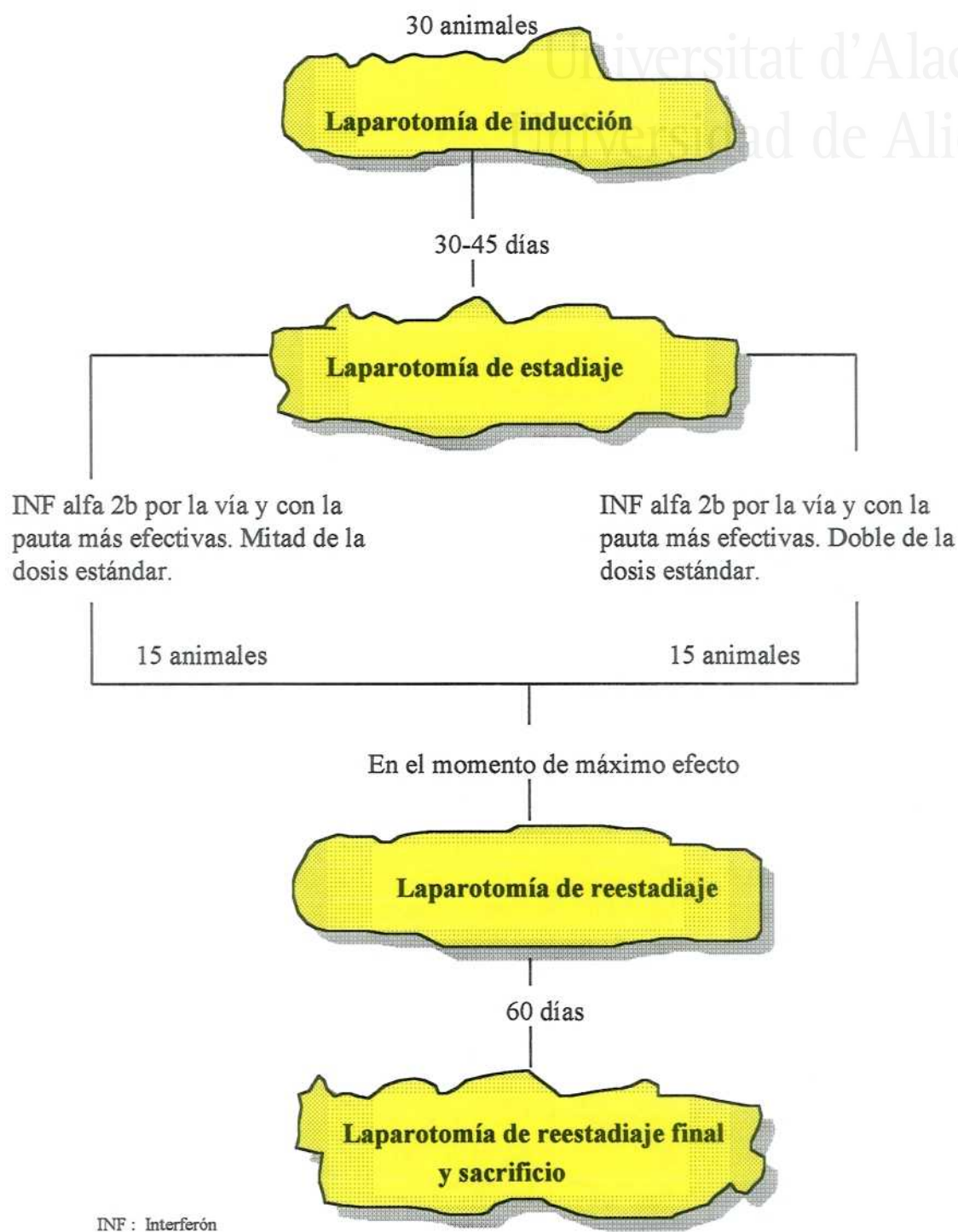
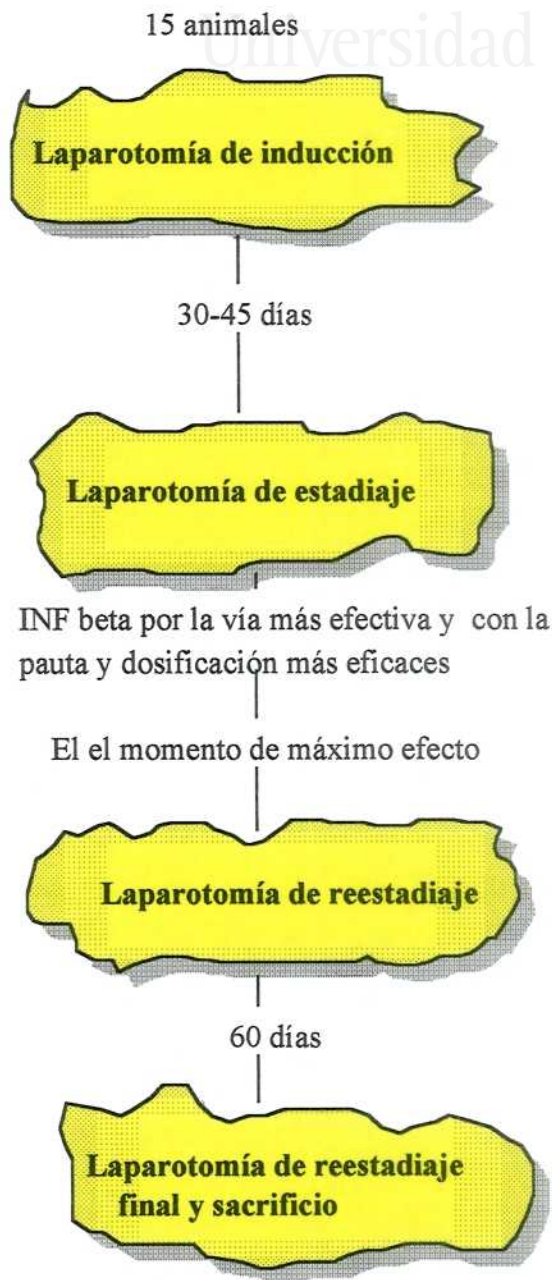


Figura 5. Diseño esquemático del experimento 4.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



INF : Interferón

Figura 6. Diseño esquemático del experimento 5.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 9. Composición del grupo de control y de los distintos grupos de tratamiento

GRUPOS	Experimento	N	Tipo Interferón	Vía	Dosis	Pauta	Momento
GRUPO A *	1	30	No Tratamiento	--	-----	----	-----
GRUPO B	1	20	Alfa 2b	IP	Estándar	Corta	En la inducción
GRUPO C	2	30	Alfa 2b	IP	Estándar	Corta	Tras el estadiaje
GRUPO D	2	30	Alfa 2b	SC	Estándar	Corta	Tras el estadiaje
GRUPO E	3	15	Alfa 2b	>eficaz	Estándar	Larga	Tras el estadiaje
GRUPO F	4	15	Alfa 2b	>eficaz	Mitad	>eficaz	Tras el estadiaje
GRUPO G	4	15	Alfa 2b	>eficaz	Doble	>eficaz	Tras el estadiaje
GRUPO H	5	15	Beta	>eficaz	>eficaz	>eficaz	Tras el estadiaje

IP: Intraperitoneal

SC: Subcutáneo

* : Grupo de control



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Toda la investigación se desarrolló en el laboratorio de cirugía experimental de la División de Ginecología de la Facultad de Medicina de Alicante. Este laboratorio se encuentra en el sótano del edificio de departamentos del campus de San Juan de Alicante. Reúne unas condiciones idóneas de tranquilidad, dotación y proximidad al estabulario y a los quirófanos experimentales del Departamento de Cirugía. Se trata de una superficie útil de unos 30 m², con un pequeño despacho de unos 7 m² circunscrito en su interior. Dispone de dos tomas de agua, toma de gases y tomas múltiples de electricidad. Se encuentra incluido dentro del acondicionamiento global del edificio, por lo que dispone de regulación de temperatura mediante aire frío/caliente. Las condiciones de iluminación fueron buenas y la limpieza, importantísima al realizar cirugía en animales, fue correcta.

Material inventariable

Relación de material utilizado para el desarrollo de la metodología básica y perteneciente a la División de Ginecología y Obstetricia, del Departamento de Ginecología y Toxicología-Legislación Sanitaria, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Alicante:

* Microscopio quirúrgico binocular Vasconcellos (Vasconcellos S.A., Brasil) equipado con tambor de lentes de 6, 10, 16, 25 y 40 aumentos y sistema fotográfico (flash MOD FC 250 y cámara Praktica modelo "Super TL 1000") (Figura 7).

* Equipo de material quirúrgico compuesto por tijeras tipo Mayo, pinzas de disección con y sin dientes de ratón, pinzas tipo Crile y tipo Kocher, portaagujas y tijeras de hilo (Figura 8).

- * Equipo de material microquirúrgico compuesto por portaagujas, tijeras de microdissección, pinzas de disección sin dientes y dos pinzas de microcirugía de punta fina.
- * Equipo de electrocoagulación bipolar AESCULAP GK 4 con terminales de pinza recta, pinza con ángulo de 90° y pinza con ángulo de 120° (Figura 9).
- * Báscula electrónica de precisión METTLER PJ 300 (Figura 10).
- * Mesa y tabla de cirugía de pequeños animales, especialmente diseñada por nosotros para esta investigación, que dispone de paneles laterales para la fijación y separación autoestática de las paredes abdominales del animal (Figura 11).
- * Centrífuga compacta KUBOTA, modelo 2010 (Kubota Corporation Bunkyo-ku, Tokio, Japón), con capacidad para 8 tubos de 17.2X110 mm, rango de 0 a 4000 r.p.m., freno automático y reloj avisador de hasta 30 minutos.
- * Congelador Zanussi de tipo arcón para la conservación de suero a -70° centígrados.

Material inventariable empleado para el procesamiento de los datos, redacción y edición de la presente memoria (propiedad privada):

- * Ordenador marca TAY, serie TOPSTAR, con procesador Pentium 166, 32 Megabytes de memoria RAM y capacidad de almacenamiento en el disco duro de 2.500 Megabytes.
- * Impresora de chorro de tinta HEWLETT PACKARD, modelo Deskjet 850C.
- * Bases de datos y cálculos estadísticos: RSIGMA y SPSS Base para Windows.

* Procesadores de texto: WORDPERFECT 5.1 y WORD (Microsoft).

* Software de gráficos: HARVARD GRAPHICS 3.0 y POWERPOINT (Microsoft).

Material inventariable utilizado para la elaboración de la iconografía en soporte de papel o diapositiva:

* Cámara YASHICA (Kyocera corporation, Shibuya-ku, Tokio 150, Japón), modelo 230-AF, con posibilidad de enfoque y exposición automáticos o manuales. Objetivo YASHICA AF F 1.8 de 50 mm. Flash CS-250AF con inclinación del cabezal de hasta 90°. Varias lentes de aumento de 52 mm, de la marca KENKO (Japón). (Propiedad privada).

* Registrador de imágenes POLAROID DIGITAL PALETTE CI-5000S (Polaroid España S.A. Paseo de la Castellana 130, Madrid) con resolución de color de 24 bits (8 bits por color primario) y 16.7 millones de colores. Interface de software Superprint para entorno windows. (Propiedad de la Unidad de Investigación del Hospital Vega Baja de Orihuela).

* Scanner de sobremesa color HP SCANJET 4P con software ADOBE PHOTOSHOP LE. (Propiedad de la Unidad de Investigación del Hospital Vega Baja de Orihuela).

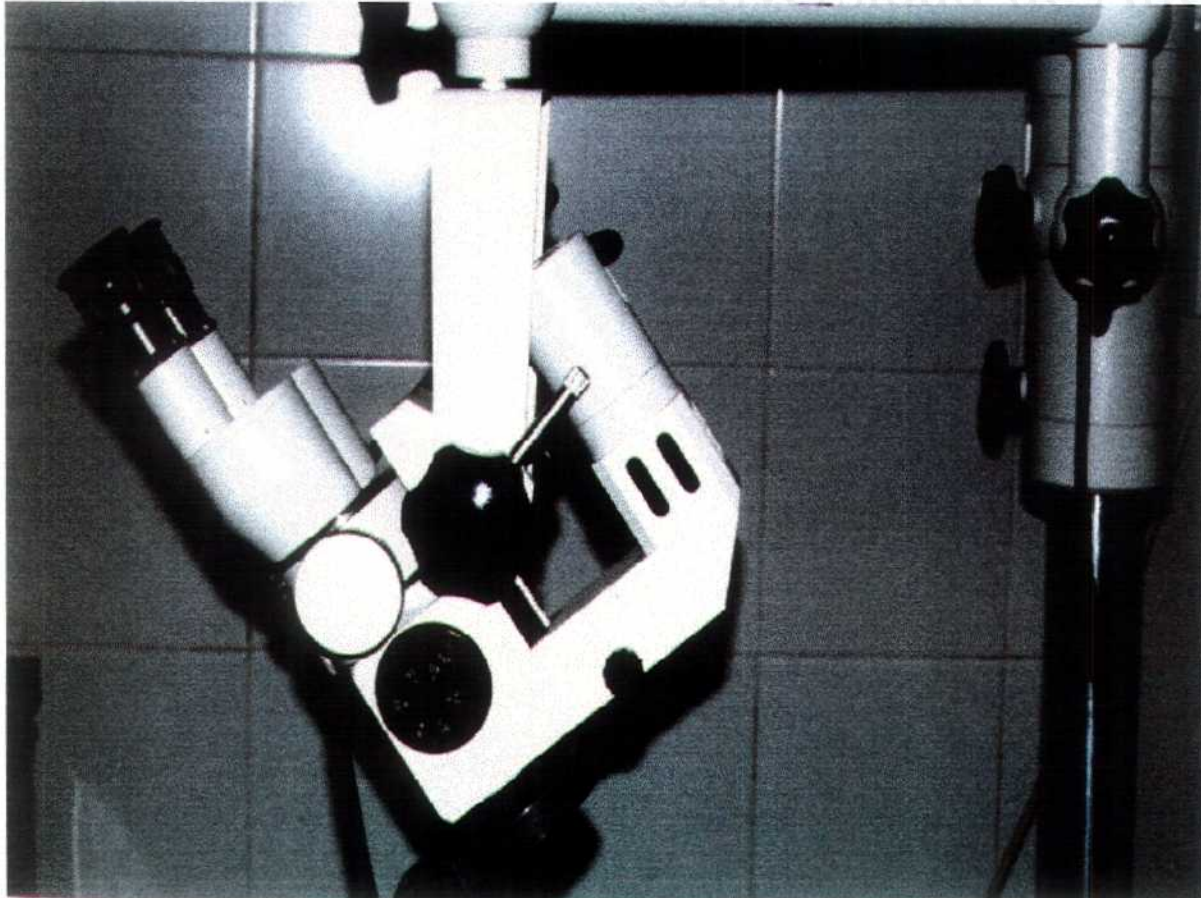


Figura 7. Microscopio quirúrgico binocular Vasconcellos.



Universitat d'Alacant
ante

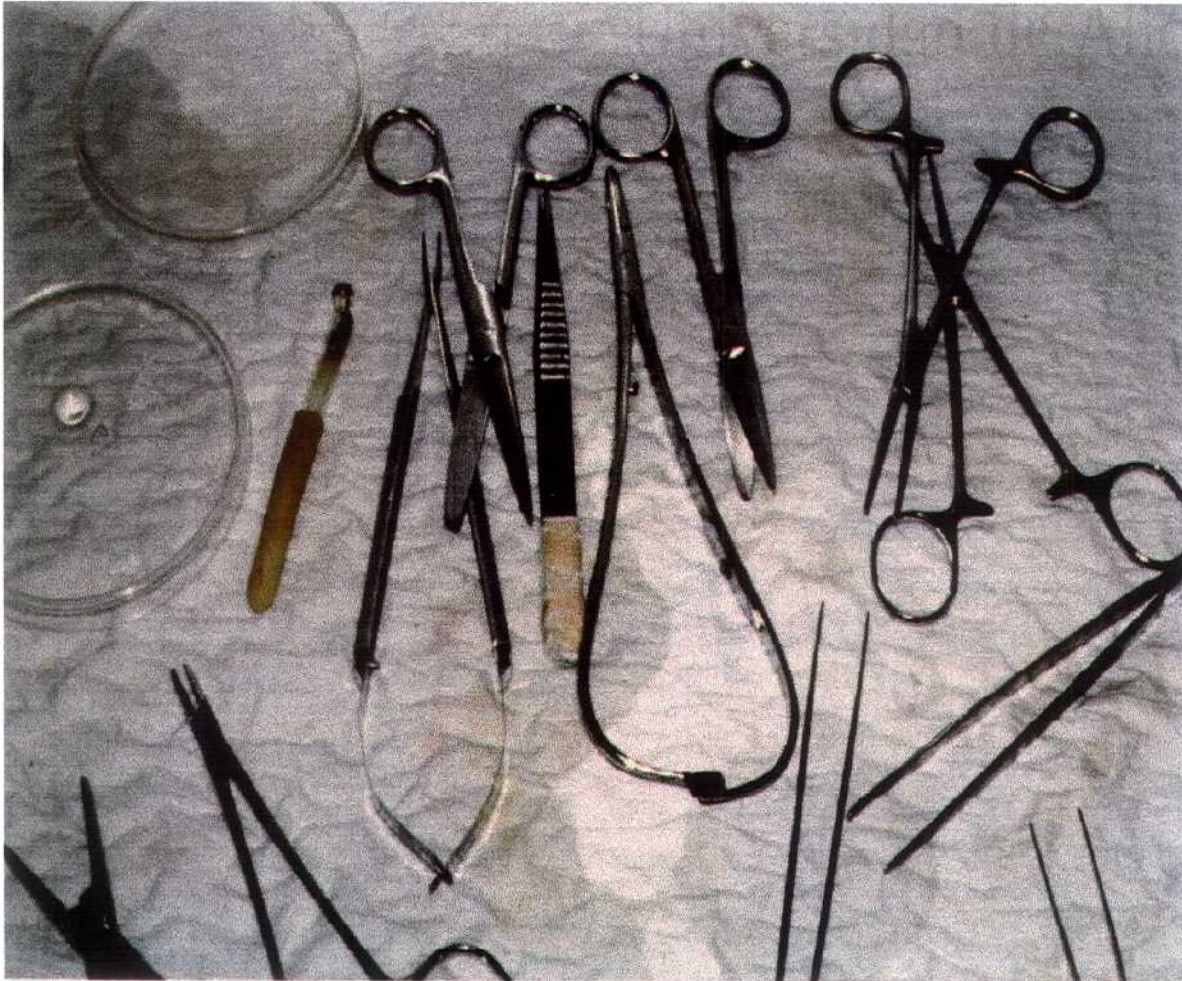


Figura 8. Material quirúrgico inventariable.



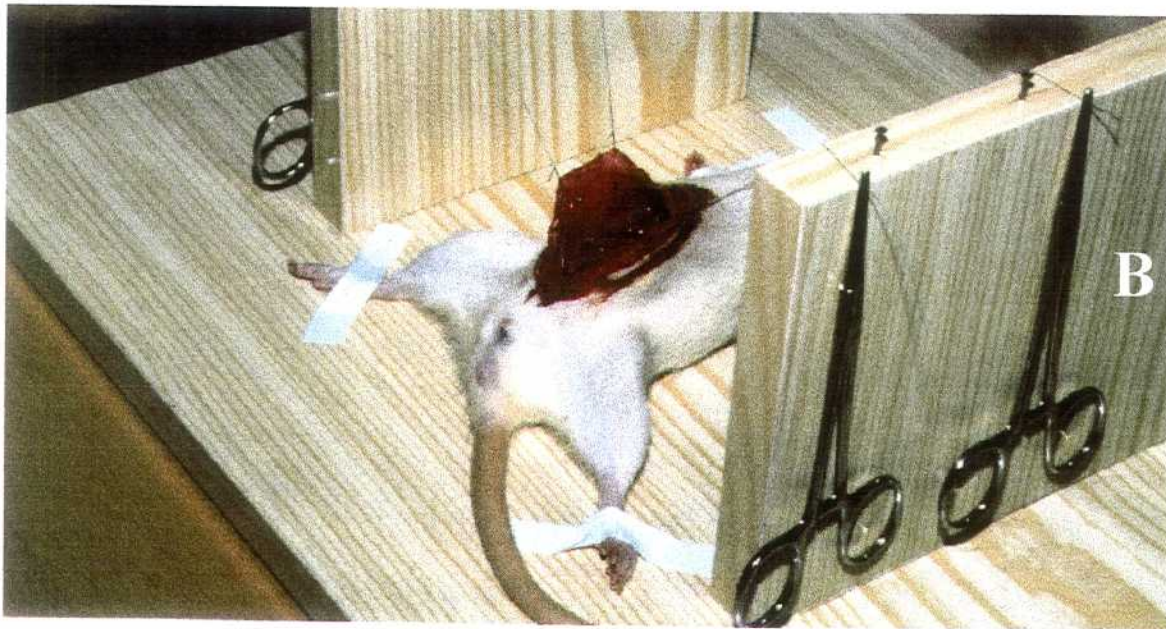
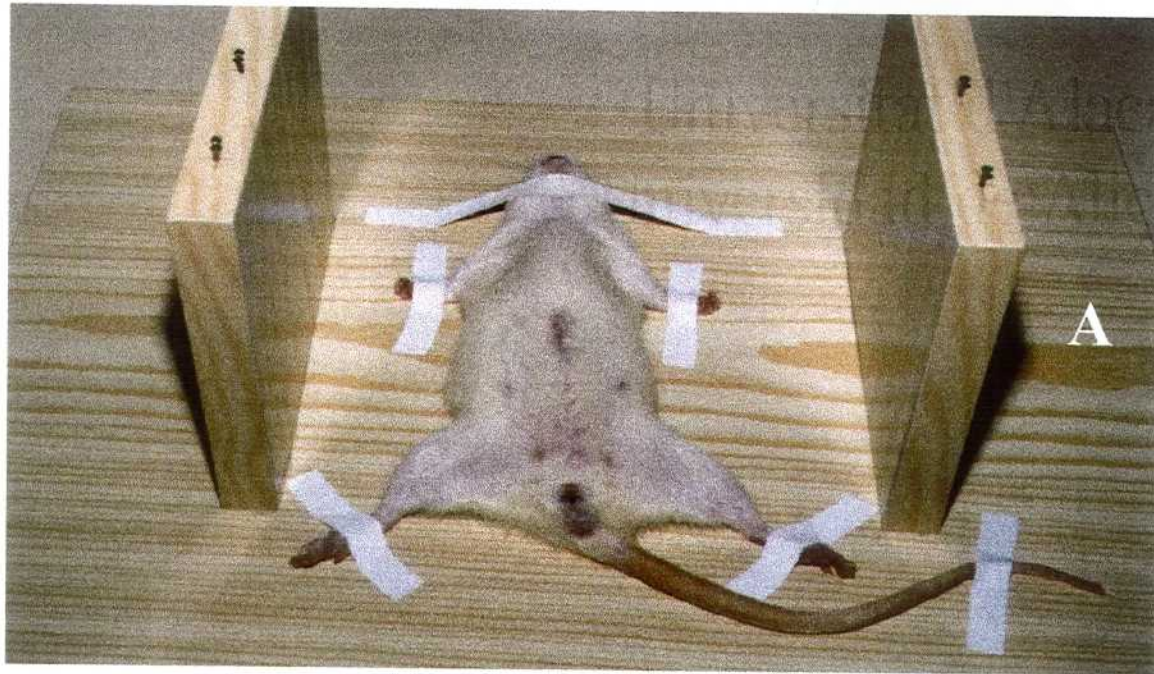
Figura 9. Electrocoagulador bipolar Aesculap GK 4.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Figura 10. Báscula electrónica de precisión Mettler PJ 300.



Figuras 11 A y B. Tabla de cirugía de pequeños animales y detalle de su empleo.

Material fungible

En mayor o menor cantidad fue necesario el empleo de diverso material fungible que se detalla a continuación:

- Jeringuillas desechables de varios volúmenes.
- Agujas desechables de varias longitudes y calibres.
- Tallas quirúrgicas desechables.
- Rollos de papel absorbente.
- Placas de Petri de material plástico.
- Suero fisiológico isotónico.
- Solución antiséptica yodada (Betadine[®]).
- Alcohol metílico de 96°.
- Formol al 10 %.
- Catgut crómico 00 con aguja PTC.
- Polipropileno monofilamento 00000 (Prolene[®]).
- Suturas de seda 0.
- Esparadrapo.
- Tubos de bioquímica.
- Tubos de Eppendorf.
- Clips y fichas de cartón para el etiquetado de las jaulas.
- Material diverso para la limpieza del instrumental.
- Guantes de cuero duro para manipular a los animales.
- Guantes de látex.
- Bolsas plásticas para residuos y cadáveres.
- Contenedores de plástico duro para residuos contaminantes.
- Papel de impresión.
- Películas fotográficas.

Animales de experimentación

Han sido empleadas un total de 194 ratas wistar (CFHB), hembras vírgenes, holoxénicas y no consanguíneas. Estos animales fueron suministrados por el animalario de la Facultad de Medicina de Alicante, situado a escasos metros del laboratorio donde se desarrolló la investigación. Una parte de los animales procedía de la propia producción del estabulario. La otra parte fue adquirida a los proveedores habituales.

Todas las ratas eran adultas en el momento de la inducción quirúrgica de la endometriosis, con edad próxima a los tres meses y peso entorno a 240 gr.. Durante toda la investigación se mantuvieron en jaulas compuestas por una caja de plástico duro transparente, cuya tapa superior era una rejilla de acero inoxidable con cubículos para depositar el alimento y el agua (Figura 12).

El lecho animal (fondo de la jaula), se compuso la mayoría de las veces de virutas de madera. En pocas ocasiones el suelo fue de serrín, con fragmentos más pequeños de madera. Este suelo resulta confortable y sano para los animales por su capacidad de absorción de orina y heces, a la vez que facilita la limpieza de las jaulas.

Las jaulas fueron habitadas por cinco animales, excepto cuando parte de los sujetos de una jaula eran operados y la otra parte no, en cuyo caso se separaban temporalmente. Es conocido el hecho de la agresividad que muestran estos animales sobre sus congéneres al advertir inmovilidad en un sujeto, llegando incluso a devorarse.

La alimentación se suministró mediante disposición "ad libitum" de pienso cilíndrico duro, elaborado mediante compresión-deshidratación, lo que permite la roedura. Su composición consta de 70.6% de hidratos de carbono, 11.1% de proteínas vegetales, 14.0% de proteínas animales, y un 4% de vitaminas y minerales. El valor calórico medio es de 3000 calorías/Kg..

Mediante "biberones", acoplados en la estructura metálica de la jaula, dispusieron de agua potable a demanda.

Los cuidadores del estabulario, además de la limpieza y cambio de jaulas, se encargaron de la alimentación de los animales. El cambio de jaulas se realizó una vez por semana. Las condiciones de estabulación fueron de 18 a 25 grados centígrados de temperatura, con una humedad relativa de 50-60%, y con ciclos diurnos de 12 horas de luz artificial.

Dentro del estabulario, nuestros animales se almacenaron en el Box 1. Una habitación de 3 m² destinada a las ratas Wistar de la División de Ginecología. En dicha habitación, las jaulas fueron colocadas en estanterías portajaulas a distintas alturas, y las condiciones de estabulación se siguieron estrictamente (Figura 13).

A lo largo de la investigación se tuvieron presentes y se respetaron rigurosamente las normas vigentes de protección animal, recogidas en el B.O.E. N° 256, Disposición General 25805 de 25-X-90.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

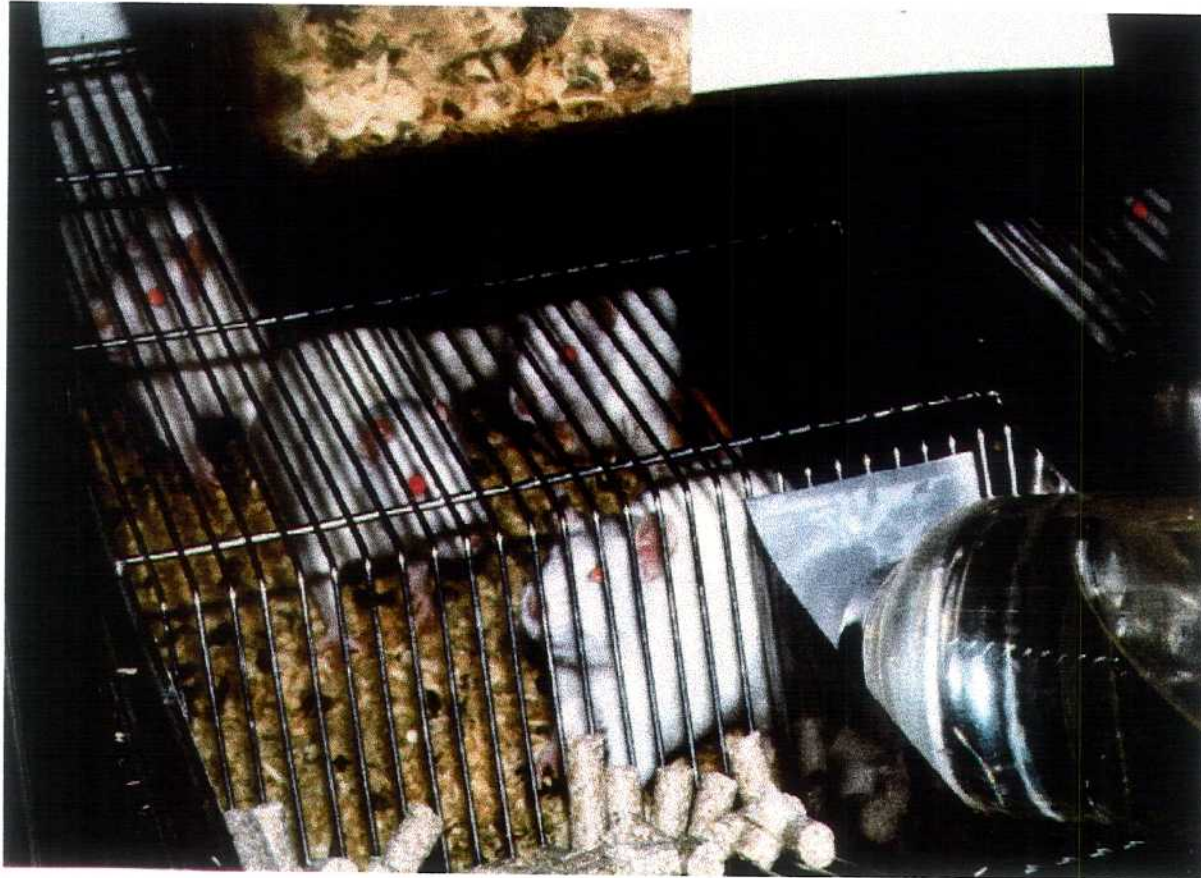


Figura 12. Jaula de mantenimiento.

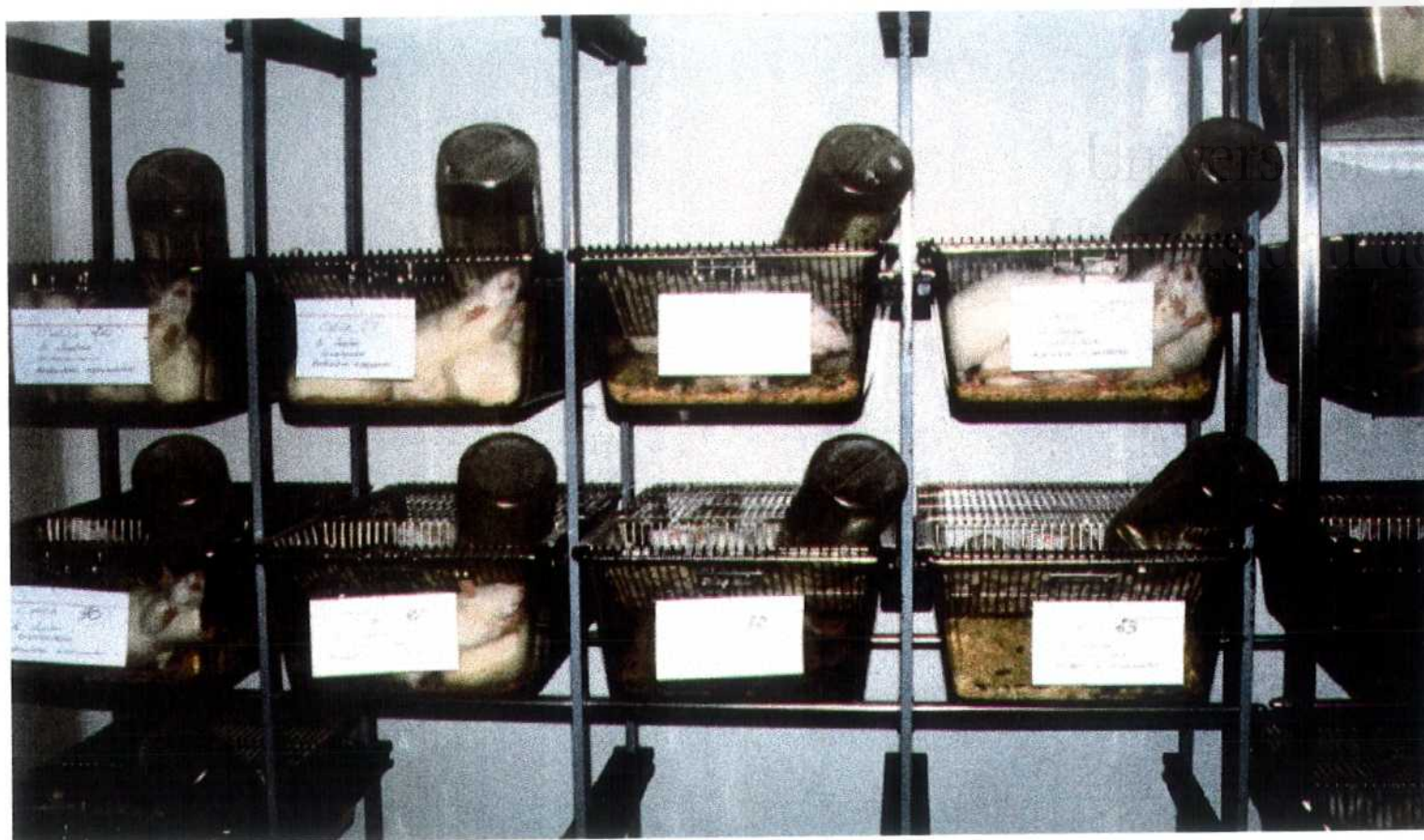


Figura 13. Estabulación de los animales en estanterías portajaulas.

METODOS

Antes de iniciar el trabajo de campo en el laboratorio, acudí al Servicio de Sanidad Exterior, de la Consejería de Sanidad de la Comunidad Valenciana, recabando información acerca de las precauciones y cuidados sanitarios que debía seguir al manipular a los animales de experimentación. Me recomendaron, además de lavados exhaustivos después de cada sesión de trabajo, la inmunización activa contra Hepatitis B, Tétanos, Tifoideas y paratifoideas. Consejos que indudablemente seguí. No recomendaron la inmunización inicial antirrábica, dada la procedencia conocida de los animales, su estatus de cautividad permanente sin contacto con otros animales y la vigilancia a que son sometidos por los veterinarios del estabulario.

Procedimiento anestésico

Para sacar a una rata de la jaula que habitaba, se introdujo la mano derecha en la misma, mientras la mano izquierda levantaba el techo metálico. Se prendía la cola del animal y con un movimiento rápido se trasladaba al animal a la plancha de trabajo contigua. En ese lugar se hacía a la rata apoyar sus extremidades superiores manteniendo en el aire sus extremidades inferiores, al tenerla suspendida de la cola con la mano derecha. La mano izquierda en ese momento, con ayuda de una talla desechable, inmovilizaba al animal mediante presión controlada.

Una vez inmovilizado en decúbito prono sobre la superficie rígida de la plancha de trabajo, mediante inyección intramuscular en el tercio superior de una extremidad inferior, administré 0.5-0.6 ml. de una combinación anestésica de Fentanilo y Droperidol (Thalamonal[®]). Esto supone para una rata adulta una dosis aproximada de Fentanilo de 0.15 mg./Kg. de peso.

Situé a la rata en una jaula de almacenamiento hasta comprobar el estado de hipnosis por la anulación completa del reflejo de enderezamiento, hecho que habitualmente sucedió en el transcurso de unos 10-15 minutos. Comprobado ésto, el paso siguiente fue pesar al animal y anotar dicho dato.

A continuación fijé la rata a la tabla quirúrgica, en decúbito supino, mediante la aplicación de tiras de esparadrapo en las cuatro extremidades, la cola y el maxilar inferior. Con pinza sin dientes tiré de la lengua para exteriorizarla y poder controlar en lo sucesivo su color.

Excepcionalmente administré una nueva dosis anestésica, si percibía una pérdida de la letargia en el animal. Generalmente el despertar se produjo a los 45-50 minutos de la administración del anestésico. Antes, en los animales que ofrecieron más resistencia a la manipulación. En algún caso aprecié vómitos al recuperar la vigilia.

En ningún caso se empleó otra sustancia para sedar o analgesiar a los animales.

Durante el periodo hipnótico la vigilancia del animal se realizó mediante observación del color de la lengua, valoración de la frecuencia cardíaca por palpación torácica y observación de la respiración espontánea.

La vigilancia en el postoperatorio inmediato se llevó a cabo mediante la observación de la respiración espontánea y la emisión de movimientos reflejos ante determinados ruidos, como estirar y soltar el látex de un guante. En este periodo se procedió a movilizar cuidadosa y periódicamente al animal, para estimularlo, siempre que se observase hipotonía o hipnosis muy profunda.

Inducción de la endometriosis experimental

La inducción de la endometriosis experimental se realizó mediante el método descrito por Jones (438).

La técnica quirúrgica fue limpia pero no estéril. Mientras se esperaba la hipnosis del animal, el instrumental era introducido en un recipiente con alcohol metílico de 96°. Antes de practicar cualquier incisión bañé toda la superficie cutánea abdominal con povidona yodada (Betadine^R). No realicé rasurado.

Anestesiado el animal y colocado en la tabla quirúrgica e inmovilizado en decúbito supino, practiqué una laparotomía media de unos 3 cm., mediante tijeras de tipo Mayo, iniciándola aproximadamente un centímetro por encima de la uretra. Se accedió a la cavidad abdominal a través de una apertura en dos planos, uno la piel y otro el plano músculo-peritoneal.

La pélvis de estos animales está ocupada por unos abundantes cojinetes grasos, por lo que la identificación y exposición de los genitales internos (ambos cuernos uterinos y ovarios) requirió cierta manipulación de las estructuras internas (Figura 14).

El siguiente paso consistió en la resección completa del cuerno uterino y ovario izquierdos, hemostasiando los vasos uterinos y ováricos mediante electrocoagulación bipolar.

La pieza resecada se colocó en una placa de Petri bañada con una pequeña cantidad de suero fisiológico. Los bordes de la laparotomía se aproximaron para mantener la cavidad abdominal del animal preservada de los fenómenos de desecación mientras se trabajaba en la placa de Petri. En esta placa, con técnica microquirúrgica y bajo visión microscópica, procedí a la eliminación de la grasa del meso y a la extirpación del ovario que sería

desechado. Abrí entonces el cuerno uterino mediante una incisión longitudinal por la línea de inserción del meso, procediendo al estiramiento del tejido, de forma que se obtenía un fragmento tisular rectangular uterino.

A diferencia de otros métodos de inducción de endometriosis, el de Jones, implanta únicamente fragmentos de endometrio y no de pared uterina completa. Así pues, bajo visión microscópica (25X), disequé el útero en dos planos, separando el endometrio del perimetrio (músculo y serosa visceral).

El endometrio se cortó para obtener cuatro fragmentos de 0.4 cm. de lado (regla milimetrada). Estos fragmentos fueron implantados, mediante un punto de sutura con Polipropileno 5/0 (Prolene^R) y cuatro nudos de cirujano (Figura 15), en la parte craneal y caudal de las paredes peritoneales derecha e izquierda (separados 1.5 cm. de la incisión laparotómica y entre sí). Para este paso supuso una gran ayuda la separación de las paredes abdominales lograda mediante la tabla quirúrgica que previamente habíamos diseñado y construido.

En todos los casos tuve la precaución de que la superficie de los implantes en contacto con el peritoneo fuese la base del endometrio, quedando la superficie de la luz endometrial hacia la cavidad peritoneal.

La pared abdominal se cerró en dos planos (músculo-peritoneal y piel) mediante suturas continuas con catgut 0. En el momento del cierre, de nuevo realicé antisepsia por empapamiento de los bordes cutáneos con povidona yodada (Betadine^R).

Estadaje de la endometriosis experimental

En la denominada laparotomía de estadaje realicé una nueva laparotomía media sobre la cicatriz previa con idéntica metodología a la primera, efectuando el estadaje de las adherencias formadas y del crecimiento de los

autotrasplantes endometriales en la forma que indico a continuación.

Una mayor o menor fibrosis de las cubiertas abdominales fue la norma. También fueron frecuentes las adherencias entre los cojinetes pélvicos grasos y la cicatriz de la laparotomía anterior. Todo ello requirió una gran precaución para no lesionar estructuras. Los implantes de endometrio fueron fácilmente identificables, y las adherencias entre ellos y otras estructuras se presentaron con mucha frecuencia. A veces fue necesario extirpar alguna adherencia para poder acceder al implante y medirlo con exactitud. Tuve mucho cuidado de no dañar, especialmente, los autotrasplantes endometriales.

Estadiadas las adherencias y los implantes, cerré la incisión de igual modo que en la primera intervención.

valoración del crecimiento de los autotrasplantes endometriales

Decidimos no sólo estadiar cada implante de endometrio autotrasplantado, sino también la endometriosis considerada por animal (suma de los cuatro implantes de cada sujeto).

Crecimiento por implante

En nuestro Departamento, Brotons demostró, con una metodología similar a la nuestra, que a los 30 días del autotrasplante endometrial los implantes iniciales se transformaban en quistes o vesículas en forma de gota que contenían un líquido claro y seroso. Estos quistes estaban recubiertos habitualmente por una estrecha capa de tejido conectivo, y en su luz existía un líquido rico en proteínas con células endometriales libres y leucocitos. El quiste solía estar totalmente revestido internamente por epitelio de tipo columnar formando glándulas ocasionalmente. Siempre se encontraba estroma subyacente, y el músculo liso

aparecía en cantidades variables (541). El aspecto visual de una de estas vesículas obtenidas por nosotros se puede apreciar en la figura 16.

En 1984 Jones estableció una clasificación de los implantes endometriósicos experimentales (438). Esta clasificación de los implantes en grados de crecimiento, con ligeras modificaciones, fue la que adoptamos para estadiar los implantes (Tabla 10).

Pero como esta investigación perseguía demostrar cualquier alteración de los implantes por efecto de un tratamiento, utilizamos también el diámetro máximo de la vesícula como sistema de evaluación. Ello nos permitió obtener datos acerca de la reducción porcentual del tamaño de los implantes, así como constatar diferencias de tamaño entre implantes, que no suponían cambio de grado en la clasificación por grados de crecimiento (Por ejemplo, una vesícula de 10 mm., y por tanto de grado III, pudo pasar tras tratamiento a tener 5 mm.. Se habría producido una reducción del implante del 50%, pero la vesícula de 5 mm. seguiría siendo de grado III).

Consideramos implantes con mal crecimiento a los que presentaron crecimiento grado 0 ó I, e implantes con buen crecimiento a los que tuvieron grado II ó III.

Crecimiento por animal

Determinamos la cantidad de endometriosis presente en cada animal, en un momento dado, por la suma de los valores individuales de cada uno de los implantes colocados.

Siguiendo lo anterior, establecimos la cuantificación de la endometriosis por animal según dos conceptos:

1. Tamaño en milímetros (suma de los diámetros máximos de cada uno de los cuatro implantes de cada animal).
2. Tamaño en grados (suma de los grados asignados a cada uno de los cuatro implantes de cada animal).

Consideramos fallida la inducción de la endometriosis en un animal cuando ninguno de los implantes presentó crecimiento alguno. Es decir, se trataba de cuatro implantes de grado 0.

Valoración de las adherencias

Las adherencias se clasificaron individualmente por implante en cuatro grados (cero, uno, dos, tres) de menor a mayor severidad. También se valoró el cuadro adherencial por animal (suma de los grados adherenciales de cada uno de los cuatro implantes que portaba cada animal). La tabla 11 recoge los criterios para clasificar las adherencias por implante.

Finalmente, para integrar en un sólo dato por animal los implantes y las adherencias, creamos un valor que contemplase la suma del tamaño en milímetros, del tamaño en grados y del grado adherencial de los cuatro implantes de cada animal.

De este modo, y resumiendo, estadiamos la endometriosis experimental por implante y por animal. Por implante, clasificamos las vesículas y las adherencias en grados. Por animal, cuantificamos según el tamaño en milímetros, tamaño en grados, grado adherencial y suma de los tres parámetros.



Universitat d'Alacant
Universitat d'Alacant

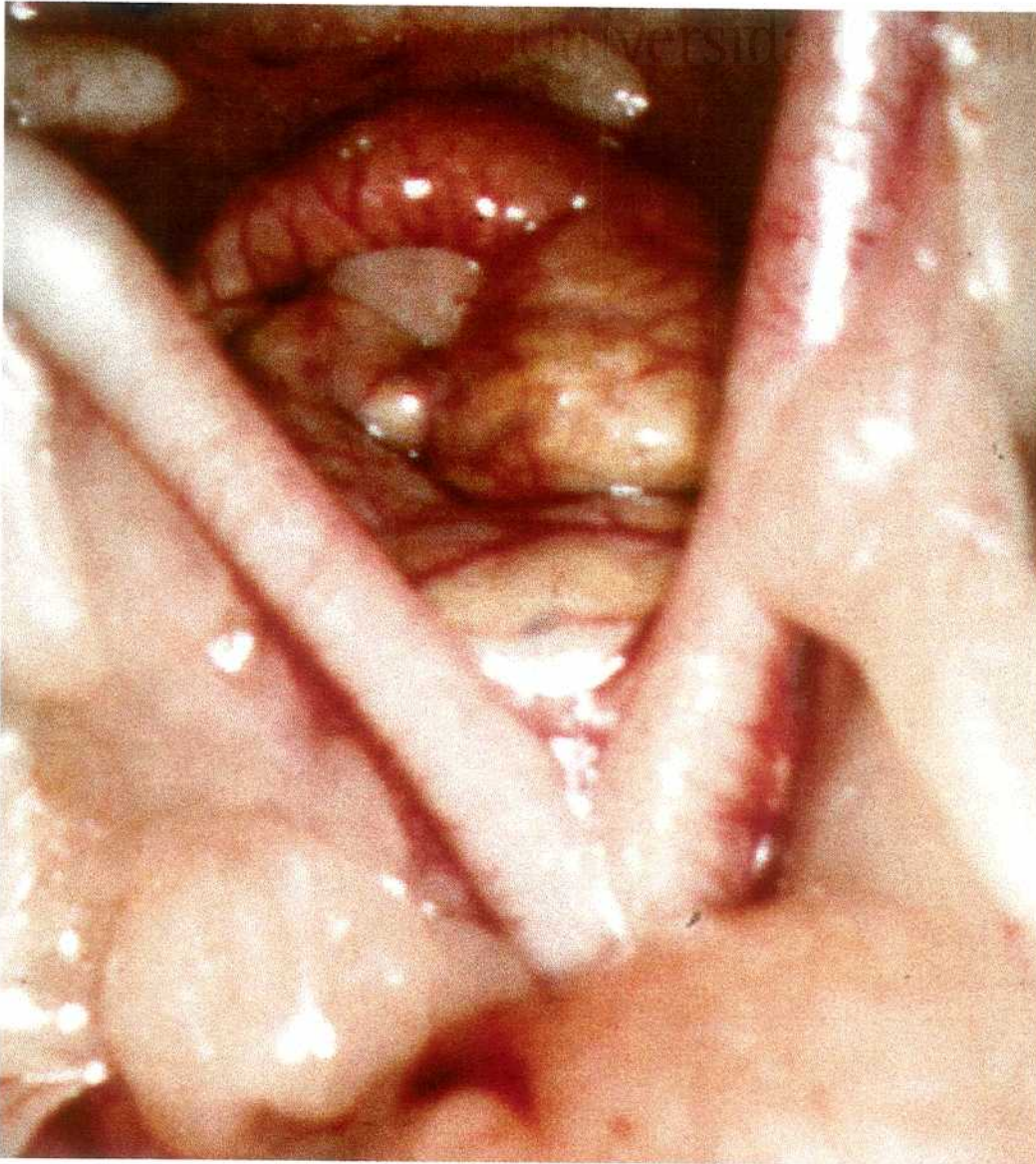


Figura 14. Utero bicorne de la rata con los cojinetes grasos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

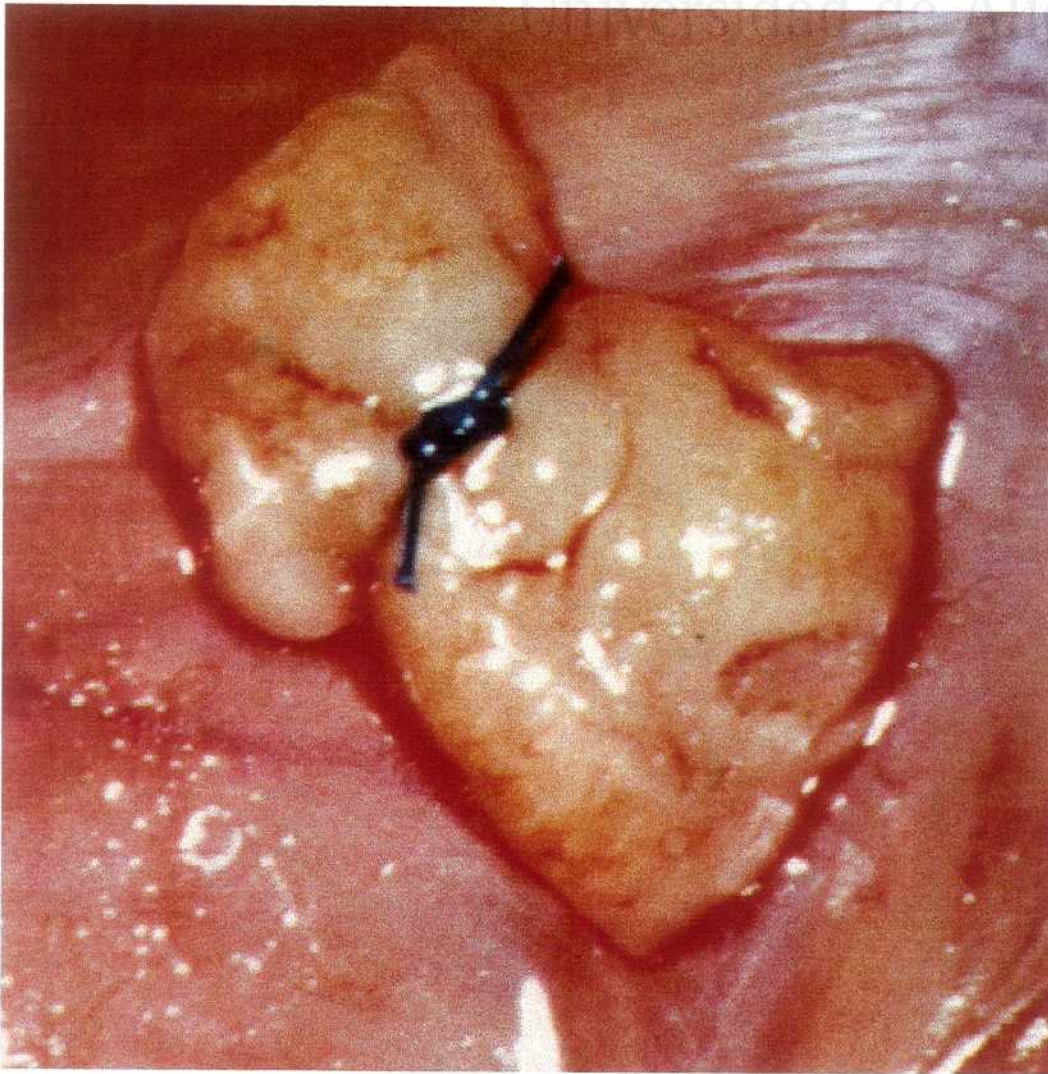


Figura 15. Fragmento de endometrio implantado en la pared peritoneal mediante un punto de polipropileno 5/0 y cuatro nudos.

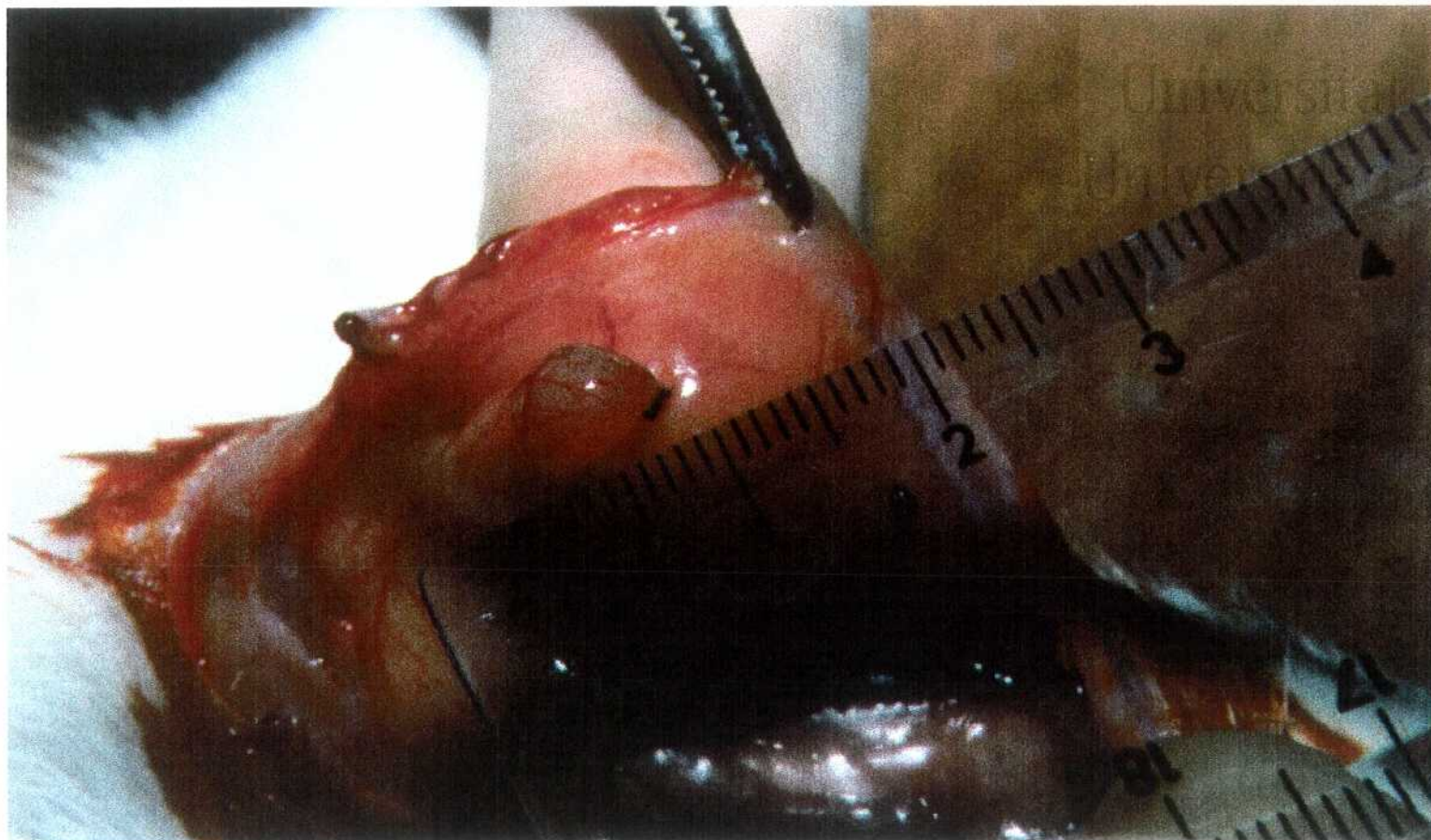


Figura 16. Vesícula endometriósica.

Tabla 10. Clasificación de los implantes en grados de crecimiento.

GRADO	DESCRIPCION
0	No se ve, o si se ve no llega a formar vesícula.
I	Cualquier vesícula menor de 2 mm, o igual a 2 mm, pero en este último caso sólida.
II	Vesícula con líquido, menor de 4.5 mm, fácilmente visible, pero el diámetro mayor es menor que el del implante original.
III	Vesícula con líquido de tamaño mayor o igual a 4.5 mm.

Tabla 11. Clasificación de las adherencias por implante.

GRADO	DESCRIPCION
Cero	Adherencias ausentes.
Uno	Adherencias laxas, velamentosas, mínimas.
Dos	Gruesas, bloqueando parcialmente el implante.
Tres	Adherencias gruesas bloqueando totalmente el implante.

Administración de los Interferones

En el momento de iniciar la investigación dispusimos de Interferón alfa 2b recombinante humano, suministrado por el laboratorio Shering-Plough (San Agustín de Guadalix. Madrid. España) que lo comercializa con el nombre de Intron A^R. De igual modo, el laboratorio de especialidades médicas Serono (Madrid. España) nos proporcionó Interferón Beta humano, que comercializa bajo la denominación de Frone^R. Ambos fármacos se presentan en viales liofilizados con diversas cantidades de sustancia activa, listos para disolver en uno o dos ml. de solución salina fisiológica.

La actividad biológica del Interferón se mide en unidades (U). Una unidad de Interferón corresponde a la cantidad de sustancia capaz de proteger, en condiciones estándar, al 50% de las células sanas de un cultivo expuesto al efecto citopático del virus empleado para dicha valoración. Los viales de ambas sustancias que nosotros empleamos fueron de 1 millón de U. Para preparar la solución, diluimos la sustancia activa de cada vial en 2 ml. de suero fisiológico estéril.

La administración intraperitoneal de una dosis estándar de Interferón consistió en dejar en dicha cavidad 0.2 ml de una solución que contenía 100.000 U de la sustancia. La administración subcutánea de una dosis estándar consistió en la inyección de la misma cantidad de solución en la zona lumbar del animal, alternando derecha e izquierda al repetir las inyecciones.

Designamos como pauta corta a la administración de una dosis de Interferón intraperitoneal o tres dosis subcutáneas (una dosis cada 48 horas), y como pauta larga, quince dosis subcutáneas (una cada 48 horas).

La aplicación de las sustancias comenzó en el curso de la laparotomía, si era intraperitoneal, o a las 48 horas de la laparotomía, si se trataba de la vía subcutánea.

Valoración de la respuesta al tratamiento

Las denominadas laparotomía de reestadiaje y laparotomía de reestadiaje final se realizaron para valorar el efecto de los distintos tratamientos sobre la endometriosis experimental a corto y a largo plazo, respectivamente.

La metodología quirúrgica y la sistemática para estadiar los implantes de endometrio autotrasplantados y las adherencias fueron idénticos a los empleados en la laparotomía de estadiaje.

Procedimiento para el sacrificio

En el curso de la laparotomía de reestadiaje final, en todos los casos, se procedió al sacrificio del animal. La sistemática de trabajo en esta última laparotomía se detalla a continuación:

Con el animal anestesiado, fijado a la mesa quirúrgica y laparotomizado, y tras llevar a cabo el estadiaje de implantes y adherencias, procedí a la obtención de sangre mediante punción cardíaca transdiafragmática en el punto en que el latido producía mayor protrusión. Realizada la cardiopunción, mediante aspiración lenta, obtuve entre 5 y 7 ml de sangre. A continuación, y sin sacar la aguja de su ubicación intracardíaca, cambié la jeringa que contenía la sangre por otra que contenía 5 ml de aire ambiente. La infusión en embolada de estos 5 ml de aire produjo embolia gaseosa y colapso con muerte instantánea del animal.

Inmediatamente trasferí la sangre a tubos parafinados y centrifugué a 3000 r.p.m. durante 10 minutos para la obtención del suero. Este suero se filtró y repartió en tubos de Eppendorf, que fueron refenciados mediante etiqueta y congelados a -70° centígrados para posteriores estudios.

En un número importante de animales, de forma previa a la cardiopunción, resequé mediante disección microquirúrgica los implantes incluyendo el punto de sutura utilizado para la fijación. Los implantes así obtenidos de cada animal se introdujeron en tubos de 10 ml que contenían formol al 10% y, tras ser referenciados, se archivaron para posteriores estudios.

Los cadáveres se introdujeron en bolsas de plástico que se ataron y depositaron en un arcón congelador, dispuesto para tal fin en el animalario, a la espera de su posterior cremación.

Registro de los datos

La cohabitación de cinco animales por jaula hizo necesario la creación de un sistema de identificación de cada uno de los cinco animales. No servía la marca pintada, puesto que las ratas lamen hasta hacer desaparecer cualquier colorante. Tampoco era útil la señal realizada con hilos de sutura porque la roedura los eliminaba. Incluso llegaban a soltar grapas metálicas. Pensamos que la realización de cortes en las orejas podía ser el mejor sistema de identificación de las ratas, y así lo hicimos. En el transcurso de la primera laparotomía procedí a marcar cada animal, de forma que en cada jaula numerada había un animal con las dos orejas íntegras, otro con las dos orejas cortadas, otro con corte en la oreja derecha, uno más con corte en la oreja izquierda y finalmente otro con un doble corte en una oreja que le confería una forma peculiar en trébol.

Identificado cada animal, todos los datos y observaciones obtenidos se recogieron de manera individual y protocolizada. A continuación se muestra el protocolo de recogida de los datos. Es apreciable que varios de los datos de los que se hizo acopio eran intrascendentes para los objetivos de la investigación propuestos, sin embargo no costó trabajo el hacerlo y quizás sean útiles en el futuro para caracterizar mejor este modelo experimental.

LAPAROTOMIA DE INDUCCION

1. Identificación
2. Fecha de nacimiento del animal
3. Fecha de la inducción
4. Edad del animal en el momento de la inducción
5. Peso al inducirlo
6. Anestesia en mililitros
7. Duración de la operación de inducción.
8. Despegamiento del endometrio (fácil, moderada dificultad, muy dificultoso)
9. Localización del implante I (IA, IP, DA, DP)
10. Vaso peritoneal en el lugar donde se colocó el implante (si, no)
11. Localización del implante II (IA, IP, DA, DP)
12. Vaso en el implante II (si, no)
13. Localización del implante III (IA, IP, DA, DP)
14. Vaso en el implante III (si, no)
15. Localización del implante IV (IA, IP, DA, DP)
16. Vaso en el implante IV (si, no)
17. Incidencias
18. Tratamiento inicial (si, no)

LAPAROTOMIA DE ESTADIAJE

19. Fecha de la laparotomía de valoración
20. Tiempo postinducción
21. Peso
22. Anestesia
23. Duración de la laparotomía de valoración
24. Vascularización de la pared (1, 2, 3)
25. Adherencias/fibrosis de pared (0, 1, 2, 3)

26. Tamaño del implante I
27. Aspecto del implante I (sólido, líquido)

28. Vasos en la superficie de la vesícula (si, no)
29. Relación de la vesícula con la adherencia (libre, bloqueada, oculta)
30. Grado del implante I (0,I,II,III)
31. Grado de la adherencia I (0,1,2,3)
32. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa, meso, intestino)

33. Tamaño del implante II
34. Aspecto del implante II (sólido, líquido)
35. Vasos en la superficie de la vesícula (si, no)
36. Relación de la vesícula con la adherencia (libre, bloqueada, oculta)
37. Grado del implante II (0,I,II,III)
38. Grado de la adherencia II (0,1,2,3)
39. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa, meso, intestino)

40. Tamaño del implante III
41. Aspecto del implante III (sólido, líquido)
42. Vasos en la superficie de la vesícula (si, no)
43. Relación de la vesícula con la adherencia (libre, bloqueada, oculta)
44. Grado del implante III (0,I,II,III)
45. Grado de la adherencia III (0,1,2,3)
46. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa, meso, intestino)

47. Tamaño del implante IV
48. Aspecto del implante IV (sólido, líquido)
49. Vasos en la superficie de la vesícula (si, no)
50. Relación de la vesícula con la adherencia (libre, bloqueada, oculta)
51. Grado del implante IV (0,I,II,III)
52. Grado de la adherencia IV (0,1,2,3)
53. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa, meso, intestino)

54. Valoración global de las adherencias. Número
55. Valoración global del tamaño de los implantes. Número
56. Valoración global del grado de los implantes. Número

57. Valoración final de los tres parámetros. Número

58. Incidencias

59. TRAT (INF-IP, INF-SC Pc, INF SC100 P1, No trat, INF 50, INF 200, INF Beta).

LAPAROTOMIA DE REESTADIAJE

60. Fecha de la laparotomía de respuesta inicial

61. Tiempo postratamiento

62. Peso

63. Anestesia

64. Duración de la laparotomía de respuesta

65. Vascularización de la pared (1,2,3)

66. Adherencias/fibrosis en la pared (0,1,2,3)

67. Tamaño del implante I

68. Aspecto del implante I (sólido, Líquido)

69. Vasos en la superficie de la vesícula (si,no)

70. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)

71. Grado del implante I (0,I,II,III)

72. Grado de la adherencia I (0,1,2,3)

73. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

74. Tamaño del implante II

75. Aspecto del implante II (sólido,líquido)

76. vasos en la superficie de la vesícula (si,no)

77. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)

78. Grado del implante II (0,I,II,III)

79. Grado de la adherencia II (0,1,2,3)

80. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

81. Tamaño del implante III

82. Aspecto del implante III (sólido,líquido)
83. Vasos en la superficie de la vesícula (si,no)
84. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)
85. Grado del implante III (0,I,II,III)
86. Grado de la adherencia III (0,1,2,3)
87. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

88. Tamaño del implante IV
89. Aspecto del implante IV (sólido,líquido)
90. Vasos en la superficie de la vesícula (si,no)
91. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)
92. Grado del implante IV (0,I,II,III)
93. Grado de la adherencia IV (0,1,2,3)
94. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

95. Valoración global de las adherencias. Número
96. Valoración global del tamaño de los implantes. Número
97. Valoración global del grado de los implantes. Número
98. Valoración final de los tres parámetros. Número
99. Incidencias

LAPAROTOMIA DE REESTADIAJE FINAL Y SACRIFICIO

100. Fecha de la laparotomía de valoración del mantenimiento de la respuesta
101. Tiempo postratamiento
102. Peso
103. Anestesia
104. Duración de la laparotomía
105. Vascularización de la pared (1,2,3)
106. Adherencias/fibrosis en la pared (0,1,2,3)

107. Tamaño del implante I
108. Aspecto del implante I (sólido,líquido)

109. Vasos en la superficie de la vesícula (si,no)
110. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)
111. Grado del implante I (0,I,II,III)
112. Grado de la adherencia I (0,1,2,3)
113. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

114. Tamaño del implante II
115. Aspecto del implante II (sólido,líquido)
116. Vasos en la superficie de la vesícula (si,no)
117. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)
118. Grado del implante II (0,I,II,III)
119. Grado de la adherencia II (0,1,2,3)
120. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

121. Tamaño del implante III
122. Aspecto del implante III (sólido,líquido)
123. Vasos en la superficie de la vesícula (si,no)
124. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)
125. Grado del implante III (0,I,II,III)
126. Grado de la adherencia III (0,1,2,3)
127. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

128. Tamaño del implante IV
129. Aspecto del implante IV (sólido,líquido)
130. Vasos en la superficie de la vesícula (si,no)
131. Relación de la vesícula con la adherencia (libre,bloqueada,oculta)
132. Grado del implante IV (0,I,II,III)
133. Grado de la adherencia IV (0,1,2,3)
134. Relación de la adherencia con otras estructuras (grasa,meso,intestino)

135. Valoración global de las adherencias. Número
136. Valoración global del tamaño de los implantes. Número
137. Valoración global del grado de los implantes. Número

138. Valoración final de los tres parámetros. Número

139. Incidencias

140. Fallecimiento (sí,no)

141. Fecha del fallecimiento

142. Día postinducción

143. Causa sospechada del fallecimiento

144. Hallazgos de la necropsia

145. Impresiones 1

146. Impresiones 2

147. Impresiones 3

Análisis estadístico de los resultados

Para la comparación de los resultados obtenidos empleamos la metodología estadística que se señala a continuación.

Cuando comparamos mediciones nominales, es decir, incidencias, utilizamos la prueba exacta de Fisher. Si se trataba de datos de intervalo, es decir, medias, comprobamos en todos los casos si la variable seguía o no una distribución normal. La bondad de ajuste a una curva de distribución normal se estableció mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si la variable seguía una distribución normal se comparaba mediante una prueba paramétrica, "t" de Student. Si la variable no seguía una distribución normal usamos una prueba no paramétrica, Mann-Whitney en el caso de datos de muestras independientes, o Wilcoxon en el caso de datos pareados.

Para la comparación múltiple de datos de intervalo establecimos un análisis de la varianza, empleando la prueba de Newman-Keuls para realizar el contraste de hipótesis.

En todos los casos adoptamos como límite de signicado estadístico la probabilidad de que un hecho ocurriese por azar no más de una vez de cada veinte ($p < 0.05$).

Relación de animales empleados y laparotomías realizadas

En la tabla 12 se muestra la distribución de los animales y laparotomías realizadas. Analizándola detenidamente es posible obtener información adicional. De los 194 animales suministrados, fueron 171 (88.15 %) los incluidos en el estudio e integrados en cada uno de los cinco experimentos. Las doce primeras ratas (6.18 %) fueron utilizadas para ejercicio de su manejo, adquirir habilidad en la técnica del autotrasplante y aprender a valorar, según los criterios establecidos, las vesículas y las adherencias. Once animales (5.67 %), inicialmente destinados a formar parte del material de investigación, fueron excluidos del estudio por causa accidental (fallecimiento antes de completar el protocolo) o incidental (fracaso de inducción).

Realicé 700 laparotomías en la totalidad de los animales, excluídas las necropsias. Calculando un tiempo medio de 25 minutos por laparotomía, ello representa unas 292 horas de tiempo quirúrgico.

Tabla 12. Distribución de los animales y laparotomías realizadas.

ANIMALES EMPLEADOS	194
- Para adquirir experiencia	12
- Excluidos por fallecimiento	8
- Excluidos por fracaso de inducción	3
- Utilizados en el experimento 1	31
- Utilizados en el experimento 2	80
- Utilizados en el experimento 3	15
- Utilizados en el experimento 4	30
- Utilizados en el experimento 5	15
 LAPAROTOMIAS EFECTUADAS	 700
- Para adquirir experiencia	37
- En animales excluidos	19
- En el experimento 1	124
- En el experimento 2	280
- En el experimento 3	60
- En el experimento 4	120
- En el experimento 5	60



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

RESULTADOS

RESULTADOS

En ocho casos se produjo el fallecimiento de la rata antes de concluir el protocolo al que estaba destinada. Ello representa una mortalidad global del 4.12%, y una mortalidad por laparotomía efectuada del 1.14%. En todos los casos el fallecimiento se produjo en el postoperatorio inmediato. Ninguno de estos animales había sufrido incidencias intraoperatorias apreciables que justificasen el óbito, y tampoco la necropsia presentó hallazgos significativos. Los números de orden de las ratas fallecidas fueron 10, 31, 37, 49, 66, 67, 79 y 106.

El éxito alcanzado en la inducción experimental de la endometriosis fue del 98.27%. Solamente tres sujetos mostraron ausencia total de crecimiento de los cuatro fragmentos de endometrio autotrasplantados, hallándose en ellos simplemente el punto de polipropileno que los fijaba.

En todos los animales los implantes de endometrio autotrasplantados crecieron más o menos, independientemente del orden en que fueron implantados (Tabla 13).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 13. Tamaño medio (milímetros) de las vesículas en la valoración inicial (laparotomía de estadiaje), según el orden en que fueron realizados los implantes. Se incluyen todos los animales del estudio.

ORDEN DE COLOCACION	TAMAÑO X ± DS
1º	4.11 ± 2.29
2º	4.35 ± 2.46
3º	4.02 ± 2.47
4º	4.19 ± 2.61

DIFERENCIAS NS

Homogeneidad de los grupos

El peso medio por animal, obtenido al inicio de cada laparotomía, tanto en el grupo de control (Grupo A) como en cada uno de los grupos que recibieron tratamiento (Grupos B, C, D, E, F, G y H), aparece en la tabla 14. El aumento de peso fue uniforme y no hubo diferencias estadísticamente significativas intergrupos antes ni después de administradas las terapias.

Tampoco hubo diferencias significativas en la cantidad media de anestésico empleada para cada intervención en el grupo de control y en los diferentes grupos de estudio (Tabla 15).

Independientemente de que alguna intervención aislada tuviera, debido a la dificultad particular del caso, una duración sensiblemente mayor que las demás, el tiempo medio que ocupó cada laparotomía fue similar en los diferentes grupos establecidos en esta investigación (Tabla 16).

La impresión subjetiva de mayor o menor dificultad encontrada al despegar el endometrio del perimetrio en el momento de la inducción de la endometriosis experimental queda reflejada en la tabla 17. En ella se aprecia que no existieron diferencias significativas intergrupos en este aspecto.

Tras ser inducida la enfermedad en el animal de laboratorio, la distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado en la laparotomía de estadiaje no presentó diferencias estadísticamente significativas al comparar lo hallado en el grupo de control (Grupo A) con lo hallado en cada uno de los grupos que recibieron posteriormente tratamiento (Grupos C, D, E, F, G y H), ni tampoco al comparar estos últimos entre sí (Tabla 18). De igual modo sucedió con la distribución de los implantes por grado adherencial encontrado en la laparotomía de estadiaje. Los grupos fueron homogéneos, no existiendo en este sentido diferencias entre ellos (Tabla 19).

Cuando consideramos el grado adherencial medio, el tamaño medio en milímetros y en grados, y la suma de los tres parámetros previos, todos ellos obtenidos por animal en la laparotomía de estadiaje, tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de control con los grupos de estudio y estos últimos entre sí (Tabla 20).



Tabla 14. Peso medio por animal en gramos, obtenido en cada laparotomía, en el grupo de control (experimento 1) y en todos los grupos de estudio (experimentos 1, 2, 3, 4 y 5).

LAPAROTOMIAS	GRUPO A X±DS	GRUPO B X±DS	GRUPO C X±DS	GRUPO D X±DS	GRUPO E X±DS	GRUPO F X±DS	GRUPO G X±DS	GRUPO H X±DS
Primera	237±36	237±32	239±16	238±16	237±8	239±14	240±17	239±18
Segunda	273±23	274±12	275±15	273±18	272±10	273±18	273±18	270±17
Tercera	285±26		287±17	288±20	286±15	287±18	288±16	287±17
Cuarta	296±27		294±18	296±15	300±18	299±20	298±36	294±13

NEWMAN-KEULS: NS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 15. Cantidad media de anestésico en mililitros utilizada en cada laparotomía en el grupo de control (experimento 1) y en todos los grupos de estudio (experimentos 1, 2, 3, 4 y 5).

LAPAROTOMIAS	GRUPO A X±DS	GRUPO B X±DS	GRUPO C X±DS	GRUPO D X±DS	GRUPO E X±DS	GRUPO F X±DS	GRUPO G X±DS	GRUPO H X±DS
Primera	0.51±0.06	0.50±0.08	0.50±0.03	0.50±0.06	0.50±0.02	0.50±0.03	0.51±0.01	0.51±0.03
Segunda	0.52±0.06	0.52±0.07	0.51±0.08	0.52±0.10	0.53±0.07	0.53±0.01	0.53±0.17	0.50±0.06
Tercera	0.51±0.10		0.51±0.16	0.51±0.08	0.53±0.01	0.53±0.12	0.52±0.01	0.50±0.13
Cuarta	0.51±0.07		0.52±0.08	0.51±0.13	0.50±0.05	0.50±0.01	0.50±0.03	0.50±0.05

NEWMAN-KEULS: NS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 16. Duración media en minutos de cada laparotomía en el grupo de control (experimento 1) y en todos los grupos de estudio (experimentos 1, 2, 3, 4 y 5).

LAPAROTOMIAS	GRUPO A X±DS	GRUPO B X±DS	GRUPO C X±DS	GRUPO D X±DS	GRUPO E X±DS	GRUPO F X±DS	GRUPO G X±DS	GRUPO H X±DS
Primera	39.90±6.89	37.50±6.12	36.36±6.38	36.43±5.21	38.40±5.22	37.20±3.34	38.80±3.91	36.20±4.10
Segunda	20.12±3.15	21.14±4.20	21.73±5.78	21.60±4.42	20.00±1.81	19.73±2.40	21.20±6.48	19.53±2.99
Tercera	21.54±4.18		21.83±8.48	20.00±3.36	21.46±2.16	21.80±2.51	20.46±2.41	20.93±2.01
Cuarta	17.58±3.61		16.93±1.22	16.93±2.44	16.73±3.84	16.13±4.24	16.32±7.12	17.46±1.62

NEWMAN-KEULS: NS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 17. Grado de dificultad encontrado en el despegamiento del endometrio durante la inducción. Comparación entre todos los grupos (tratados y no tratados).

DIFICULTAD	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C		GRUPO D		GRUPO E		GRUPO F		GRUPO G		GRUPO H	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Fácil	23	(74.20)	12	(60.00)	16	(53.33)	15	(50.00)	9	(60.00)	10	(66.66)	8	(53.34)	10	(66.66)
Moder. dif.	4	(12.90)	4	(20.00)	6	(20.00)	10	(33.33)	3	(20.00)	2	(13.34)	4	(26.66)	3	(20.00)
Muy dif.	4	(12.90)	4	(20.00)	8	(26.67)	5	(16.67)	3	(20.00)	3	(20.00)	3	(20.00)	2	(13.34)
TOTAL	31	(100.00)	20	(100.00)	30	(100.00)	30	(100.00)	15	(100.00)	15	(100.00)	15	(100.00)	15	(100.00)

Moder. dif. : Moderada dificultad

Muy dif. : Muy dificultoso

FISHER: NS



Tabla 18. Distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado en la laparotomía de estadiaje. Comparación entre los diversos grupos. Queda excluido de esta tabla el grupo B, que recibió tratamiento primario.

GRADO DE CRECIMIENTO	GRUPO A		GRUPO C		GRUPO D		GRUPO E		GRUPO F		GRUPO G		GRUPO H	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
0	11	(8.87)	13	(10.83)	13	(10.83)	2	(3.33)	7	(11.67)	5	(8.33)	10	(16.66)
I	8	(6.45)	4	(3.33)	10	(8.33)	2	(3.33)	0	(0.00)	3	(5.00)	2	(3.34)
II	53	(42.74)	49	(40.84)	43	(35.84)	32	(53.34)	33	(55.00)	34	(56.67)	26	(43.33)
III	52	(41.94)	54	(45.00)	54	(45.00)	24	(40.00)	20	(33.33)	18	(30.00)	22	(36.67)
TOTAL	124	(100.00)	120	(100.00)	120	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

FISHER: NS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 19. Distribución de los implantes por grado adherencial encontrado en la laparotomía de estadiaje. Comparación entre los diversos grupos. Queda excluido de esta tabla el grupo B, que recibió tratamiento primario.

GRADO ADHERENCIAL	GRUPO A		GRUPO C		GRUPO D		GRUPO E		GRUPO F		GRUPO G		GRUPO H	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
CERO	7	(5.65)	7	(5.83)	7	(5.83)	2	(3.33)	2	(3.33)	4	(6.66)	5	(8.33)
UNO	42	(33.87)	49	(40.83)	46	(38.33)	20	(33.33)	25	(41.66)	25	(41.66)	22	(36.67)
DOS	50	(40.32)	36	(30.00)	42	(35.00)	20	(33.33)	15	(25.00)	18	(30.01)	17	(28.33)
TRES	25	(20.16)	28	(23.34)	25	(20.84)	18	(30.01)	18	(30.01)	13	(21.67)	16	(26.67)
TOTAL	124	(100.00)	120	(100.00)	120	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

FISHER: NS

Tabla 20. Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal en la laparotomía de estadiaje. Comparación entre los diversos grupos. Queda excluido de ésta tabla el grupo B que recibió tratamiento primario.

LAPAROTOMIAS	GRUPO A X±DS	GRUPO C X±DS	GRUPO D X±DS	GRUPO E X±DS	GRUPO F X±DS	GRUPO G X±DS	GRUPO H X±DS
Grado adher.	7.00±2.20	6.80±1.71	6.23±2.06	7.60±2.38	7.26±1.86	6.66±2.16	6.80±3.21
Milímetros	17.29±6.74	19.71±7.81	18.08±9.20	16.43±3.63	17.56±4.56	16.23±5.31	16.70±5.84
Grados	8.70±1.98	9.20±2.28	8.73±2.76	9.20±1.20	8.40±2.29	8.33±2.55	8.86±2.69
Suma param.	32.67±9.98	35.48±10.41	32.98±12.29	33.26±6.65	33.23±8.21	31.90±9.45	32.36±8.27

Grado adher. : Grado adherencial

Suma param. : Suma de parámetros

NEWMAN-KEULS: NS

Primer experimento: Establecimiento de un grupo control de evolución espontánea de los implantes. Investigación del efecto de una dosis estándar intraperitoneal de Interferón alfa 2b en el momento de la inducción.

Una representación esquemática de este experimento, tal y como se ejecutó, se puede ver en la figura 17.

Respecto al grupo A (grupo de control, animales no tratados), los resultados hallados fueron los siguientes:

La distribución de los implantes por grado de crecimiento no cambió de forma significativa a los 60 días (laparotomía de reestadiaje) ni a los 120 días (laparotomía final) de la valoración inicial (laparotomía de estadiaje) (Tabla 21). No obstante, algunas vesículas sufrieron cambios. Así en la tabla 22 se analiza, de forma detallada, la modificación del grado de los implantes desde la laparotomía de estadiaje hasta la laparotomía final. En ella observamos una mayor tendencia de las vesículas a permanecer estables en los grados extremos (0 y III), existiendo una mayor variabilidad en los grados intermedios (I y II).

Aunque la distribución de los implantes por grado adherencial no cambió de forma estadísticamente significativa en las distintas laparotomías (Tabla 23), sí se encontraron diferencias cuando el grado adherencial se consideró por animal. Esto se aprecia en la tabla 24, donde se objetiva un aumento en el grado adherencial medio por animal a medida que se suceden las intervenciones, llegando a ser las diferencias estadísticamente significativas al comparar lo hallado en la valoración inicial (laparotomía de estadiaje) con lo hallado en la valoración final (laparotomía final) ($p < 0.05$). Este incremento en el grado adherencial por animal al sucederse las laparotomías propició que, a pesar de no existir modificación en el tamaño medio de la endometriosis (tanto en milímetros como en grados), el valor medio por animal resultante de la suma del tamaño de los cuatro implantes y el grado adherencial de los mismos, fuese significativamente mayor en la valoración final (laparotomía final) que en la

inicial (laparotomía de estadiaje).

Cuando sumamos el diámetro mayor de los 124 implantes realizados a estos 31 animales y comparamos dicho valor en cada una de las tres laparotomías, observamos que se produjo una reducción, con respecto al valor inicial (estadiaje) (536 mm), del 1.40% en la laparotomía de reestadiaje (528.5 mm), y un incremento del 1.96% en la laparotomía final (546.5 mm). Del mismo modo, cuando sumamos el grado de crecimiento asignado a cada uno de los 124 implantes realizados a estos 31 animales y comparamos los valores así obtenidos en cada una de las tres laparotomías, apreciamos incrementos del 1.85% en la laparotomía de reestadiaje y del 2.59% en la laparotomía final con respecto a la valoración inicial (laparotomía de estadiaje). En la figura 18 se muestra una imagen ilustrativa de ese escaso cambio en la cantidad global de la endometriosis presente en este grupo.

Respecto al grupo B (animales que recibieron tratamiento en el momento de la inducción de la endometriosis), los resultados hallados fueron los siguientes:

Al comparar el grupo B con el grupo de control (grupo A) en el momento de la valoración de la endometriosis conseguida (laparotomía de estadiaje), no fue posible encontrar diferencias significativas en la distribución de los implantes por grado de crecimiento (Tabla 25).

La distribución de los implantes por grado adherencial mostró una menor tendencia en el grupo B a presentar grados adherenciales más severos que en el grupo A. No obstante, las diferencias sólo alcanzaron significación estadística para las adherencias de grado Dos ($p < 0.05$) (Tabla 26).

Considerada la enfermedad no por implante sino por animal, ni el grado adherencial medio, ni el tamaño medio en milímetros o en grados, ni el valor medio resultante de la suma de los tres parámetros previos fueron diferentes en el grupo B (tratado) con respecto al grupo A (control) (Tabla 27).

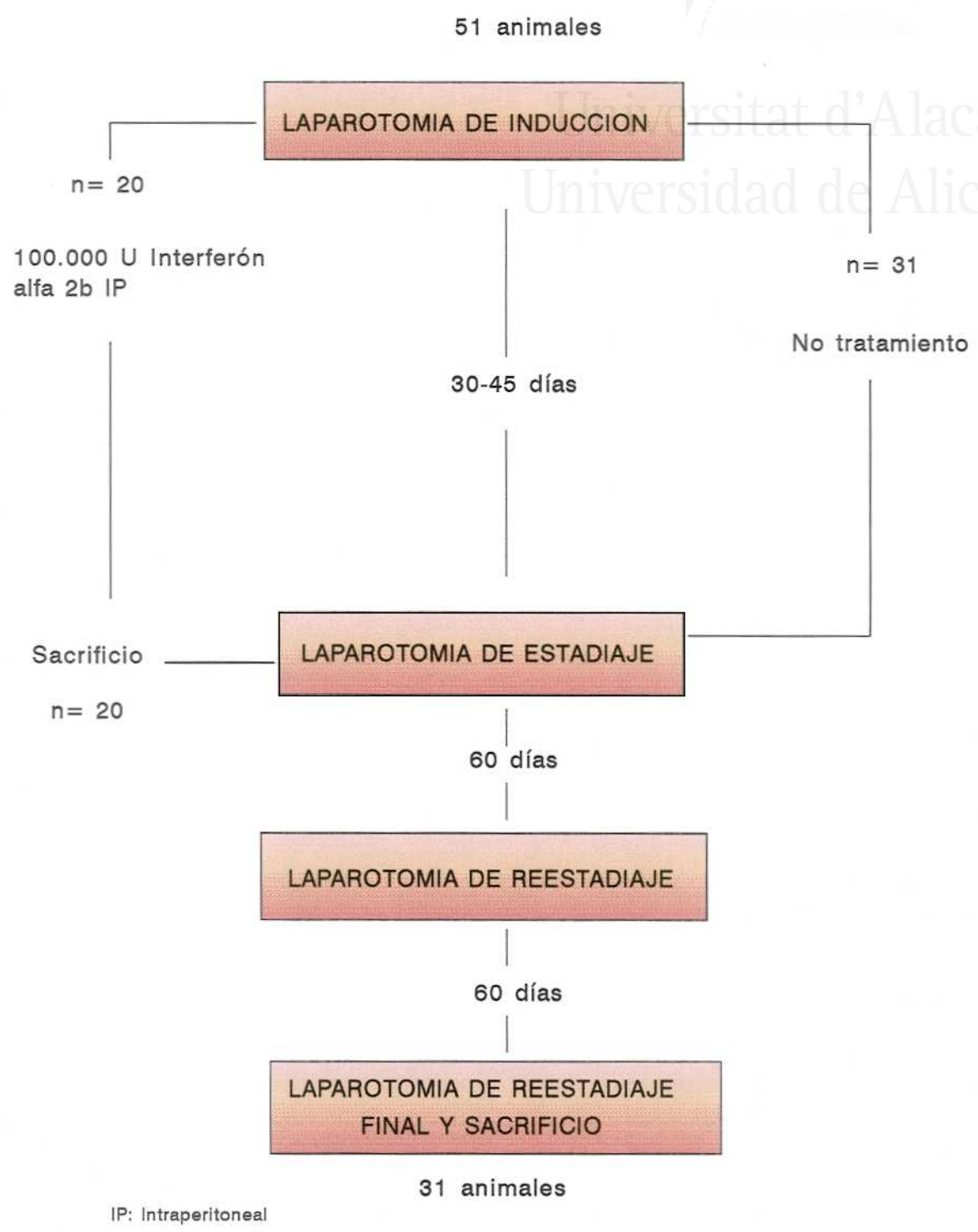


Figura 17. Representación esquemática del experimento 1.

Tabla 23. Experimento 1. Grupo A (animales no tratados).
Distribución de los implantes por grado adherencial en las
laparotomías de estadiaje, reestadiaje y final.

GRADO AHERENCIAL	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Cero	7	(5.65)	7	(5.65)	6	(4.84)
Uno	42	(33.87)	34	(27.42)	34	(27.42)
Dos	50	(40.32)	58	(46.77)	50	(40.32)
Tres	25	(20.16)	25	(20.16)	34	(27.42)
TOTAL	124	(100.00)	124	(100.00)	124	(100.00)

Fisher: Diferencias NS.

Tabla 21. Experimento 1. Grupo A (animales no tratados).
Distribución de los implantes por grado de crecimiento en las laparotomías de estadiaje, reestadiaje y final.

GRADO DE CRECIMIENTO	Estadiaje N (%)	Reestadiaje N (%)	Final N (%)
0	11 (8.87)	10 (8.06)	12 (9.68)
I	8 (6.45)	10 (8.06)	8 (6.45)
II	53 (42.74)	47 (37.91)	43 (34.68)
III	52 (41.94)	57 (45.97)	61 (49.19)
TOTAL	124 (100.00)	124 (100.00)	124(100.00)

Fisher: Diferencias NS.

Tabla 22. Experimento 1. Grupo A (animales no tratados). Modificación del grado de los implantes desde la laparotomía de estadiaje hasta la laparotomía final.

GRADO INICIAL	GRADO FINAL								TOTAL N (%)	
	0		I		II		III			
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)		
0	8	(72.73)	0	(0.00)	3	(27.27)	0	(0.00)	11	(8.87)
I	1	(12.50)	4	(50.00)	3	(37.50)	0	(0.00)	8	(6.45)
II	3	(5.66)	4	(7.55)	34	(64.15)	12	(22.64)	53	(42.74)
III	0	(0.00)	0	(0.00)	3	(5.77)	49	(94.23)	52	(41.94)
TOTAL	12	(9.68)	8	(6.45)	43	(34.68)	61	(49.19)	124	(100.0)

Fisher: Diferencias NS. entre los totales.

■ Implantes que permanecieron inalterados.

Tabla 24. Experimento 1. Grupo A (animales no tratados). Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados, y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal en cada una de las tres laparotomías.

	Estadíaaje X ± DS	Reestadíaaje X ± DS	Final X ± DS
Grado adherencial *	7.00±2.20	7.29±2.10	7.61±2.04
Milímetros	17.29±6.74	17.04±7.44	17.62±7.51
Grados	8.70±1.98	8.87±2.24	8.93±2.51
Suma parámetros *	32.67±9.98	33.53±10.51	34.17±10.94

* Newman-Keuls: $p < 0.05$ en la comparación estadíaaje/final.

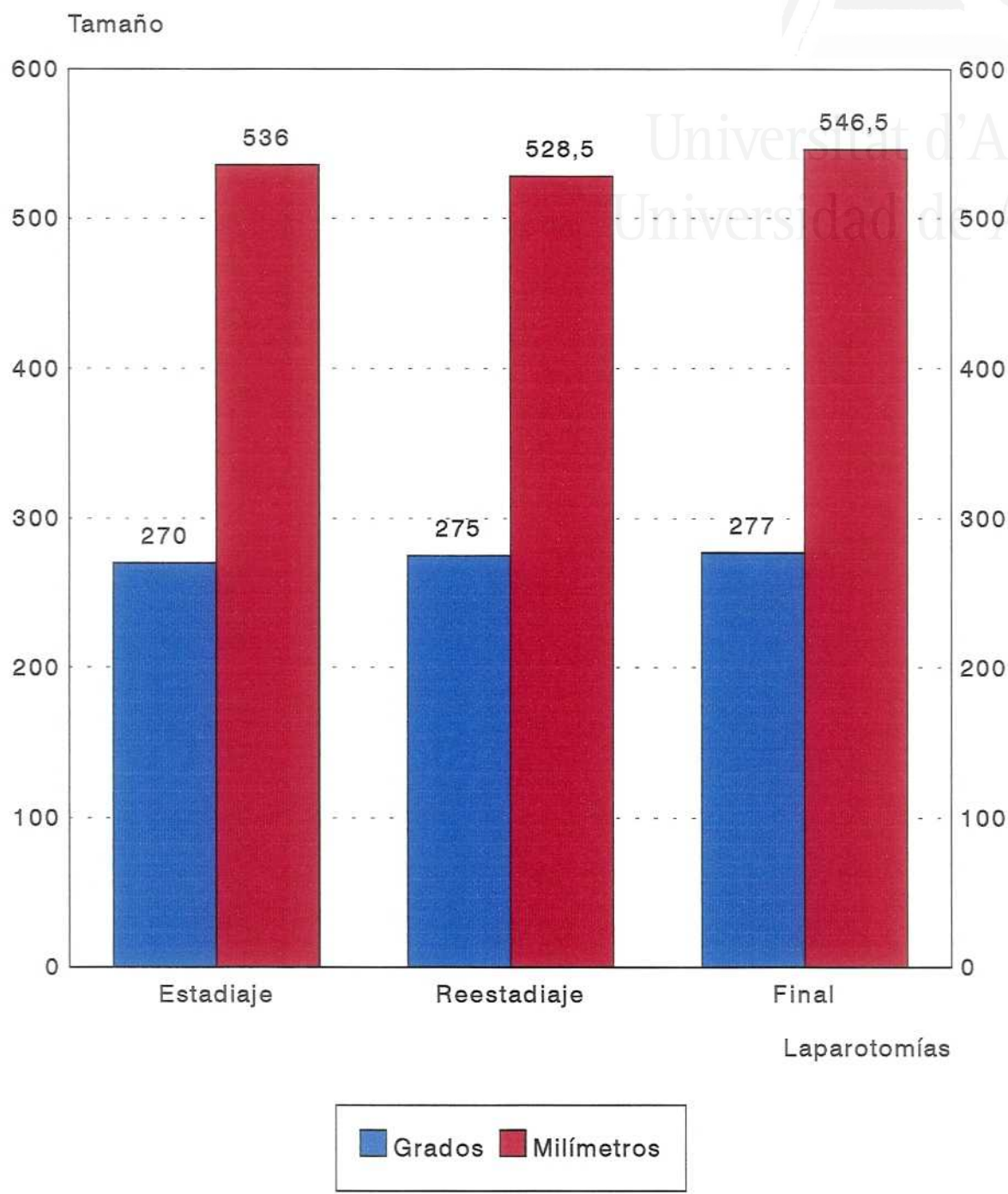
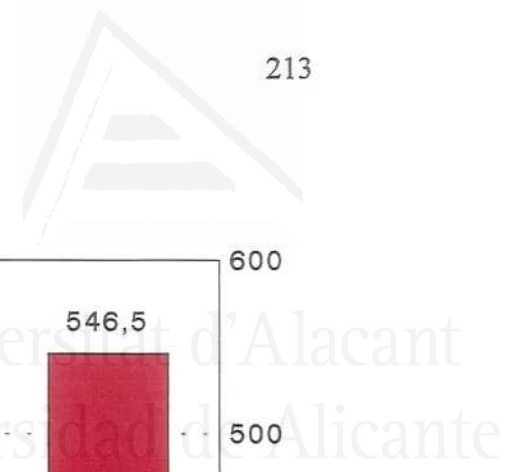


Figura 18. Experimento 1. Grupo A (animales no tratados).
Modificación de la suma del tamaño de todos los implantes.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 25. Experimento 1. Distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado en la laparotomía de estadiaje. Comparación entre los animales tratados en el momento de la inducción (grupo B) y el grupo control de animales no tratados (grupo A)

GRADO DE CRECIMIENTO	Grupo B		Grupo A		Fisher P
	N	(%)	N	(%)	
0	10	(12.50)	11	(8.87)	NS
I	10	(12.50)	8	(6.45)	NS
II	24	(30.00)	53	(42.74)	NS
III	36	(45.00)	52	(41.94)	NS
TOTAL	80	(100.00)	124	(100.00)	



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 26. Experimento 1. Distribución de los implantes por grado adherencial encontrado en la laparotomía de estadiaje. Comparación entre los animales tratados en el momento de la inducción (grupo B) y el grupo control de animales no tratados (grupo A).

GRADO ADHERENCIAL	Grupo B		Grupo A		Fisher P
	N	(%)	N	(%)	
Cero	5	(6.25)	7	(5.65)	NS
Uno	37	(46.25)	42	(33.87)	NS
Dos	18	(22.50)	50	(40.32)	p < 0.05
Tres	20	(25.00)	25	(20.16)	NS
TOTAL	80	(100.00)	124	(100.00)	

Tabla 27. Experimento 1. Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal. Comparación entre los animales tratados en el momento de la inducción (grupo B) y el grupo control de animales no tratados (grupo A).

	Grupo B	Grupo A	t-Student
	X ± DS	X ± DS	P
Grado adherencial	6.65±2.41	7.00±2.20	NS *
Milímetros	16.95±6.43	17.29±6.74	NS
Grados	8.30±2.81	8.70±1.98	NS
Suma de parámetros	31.90±9.50	32.67±9.98	NS

* Mann-Whitney.

Segundo experimento: Determinación del efecto de pautas cortas de tratamiento con Interferón alfa 2b. Determinación de la vía de administración más efectiva. Estudio de la farmacodinamia sobre la enfermedad.

La figura 19 ofrece una representación esquemática del experimento, tal y como se llevó a cabo.

Respecto al grupo C (animales tratados tras el estadiaje con una dosis estándar de Interferón alfa 2b intraperitoneal), los resultados hallados fueron los siguientes:

Al comparar la distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento) y final (120 días después del tratamiento) (Tabla 28), se aprecia un aumento del porcentaje de implantes con mal crecimiento y una disminución de los implantes con buen crecimiento en la laparotomía final. Las diferencias fueron significativas para las vesículas de grado 0 y II.

La distribución de los implantes por grado adherencial no se vió afectada en este grupo por efecto del tratamiento (Tabla 29).

Considerando la endometriosis por animal (Tabla 30), todavía fue más evidente el beneficio del tratamiento, apreciándose, al comparar lo encontrado antes y después de administrado el mismo, diferencias altamente significativas en el tamaño medio y suma de parámetros. Sin embargo, el grado adherencial medio por animal permaneció inalterado.

Cuando sumamos el diámetro mayor de los 120 implantes realizados a estos 30 animales del grupo C, observamos que se produjo una reducción del 24.73% en la valoración final (después del tratamiento) (laparotomía final) con respecto al valor inicial (antes del tratamiento) (laparotomía de estadiaje). De

forma similar, cuando sumamos el grado de crecimiento asignado a cada uno de los 120 implantes realizados a estos 30 animales, observamos una reducción del 20.29% en el valor obtenido posteriormente al tratamiento con respecto al valor obtenido previamente al mismo. Gráficamente la figura 20 refleja estos últimos datos.

Respecto al grupo D (animales tratados tras el estadiaje con tres dosis estándar de Interferón alfa 2b por vía subcutánea), los resultados hallados fueron los siguientes:

La distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado antes (estadiaje) y después del tratamiento (final) mostró un incremento altamente significativo de los grados 0 ($p < 0.001$) y una disminución de los grados I, II y III que no alcanzó significación estadística (Tabla 31). Sin embargo, al analizar los implantes según su distribución en mal crecimiento (grados 0 y I) o buen crecimiento (grados II y III) las diferencias fueron significativas.

En la tabla 32 se refleja la distribución de los implantes según el grado adherencial encontrado antes (estadiaje) y después del tratamiento (final). En conjunto se aprecia también, posteriormente al tratamiento, una tendencia hacia la disminución de grado, siendo las diferencias estadísticamente significativas para los implantes de grado uno y tres.

Al considerar la endometriosis por animal (Tabla 33), tanto el tamaño medio de la enfermedad como la suma de grado adherencial medio y tamaño medio, experimentaron después del tratamiento disminuciones altamente significativas. No ocurrió lo mismo con el grado adherencial medio, para el que no fue posible hallar diferencias estadísticamente significativas por efecto de la terapia.

Se produjo en este grupo D, después de administrado el tratamiento, una disminución del tamaño global de la enfermedad del 22.67% cuando se

consideró la suma del diámetro mayor de todos los implantes, y del 22.91% cuando fue la suma de los grados de crecimiento asignados a cada implante la que se tuvo en cuenta. El histograma de la figura 21 representa gráficamente estos hechos.

Finalizada la exposición de los resultados obtenidos por efecto de las pautas cortas de Interferón alfa 2b vía intraperitoneal (grupo C) y subcutánea (grupo D), realizamos, para determinar la vía de administración más efectiva, una comparación múltiple entre los grupos A (control), C (Interferón intraperitoneal) y D (Interferón subcutáneo), respecto al grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados, y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal después de administrado el tratamiento (laparotomía final) (Tabla 34). Esta comparación mostró una reducción estadísticamente significativa del tamaño medio de la endometriosis en los grupos tratados con respecto al grupo control, sin que se apreciaran diferencias en este sentido entre una y otra vías de administración. Por contra, el grado adherencial medio fue menor en el grupo tratado por vía subcutánea (grupo D) que en el tratado por vía intraperitoneal (grupo C) y en el grupo control (grupo A), alcanzando las diferencias significación estadística.

Respecto al estudio de la dinámica de actuación del fármaco sobre la endometriosis experimental, hallamos los siguientes resultados:

En la tabla 35 se evalúa la modificación de los valores obtenidos por la suma del tamaño en grados y en milímetros de todos los implantes al sexto, duodécimo y vigésimo días postratamiento, con respecto a los valores obtenidos antes de aplicada la terapia (estadiaje) en el grupo C (Interferón alfa 2b intraperitoneal). Esta tabla pone de manifiesto que en los 10 animales laparotomizados a los 6 días de haber recibido el fármaco, existió una reducción de la suma del tamaño de todos los implantes del 28.73% si se valoraba en grados, y del 33.42% cuando la cuantificación era en milímetros. El grupo intervenido a los 12 días presentó una disminución del tamaño en grados del 19.77%, y del 33.42% del tamaño en milímetros. Los 10 animales restantes,

operados a los 20 días tras la administración del tratamiento, mostraron disminuciones del tamaño en grados y milímetros del 20.79% y 19.91% respectivamente.

Contrariamente, en las ratas tratadas con tres dosis de Interferón alfa 2b subcutáneo (grupo D), encontramos reducciones en grados y milímetros al sexto día del 8.99% y 12.90%, al duodécimo día del 19.05% y 13.74% y al vigésimo día del 20.79% y 17.61% respectivamente (Tabla 36).

Integrando estos resultados con los obtenidos para cada grupo en la laparotomía final (120 días tras el tratamiento) elaboramos las figuras 22 y 23. Estos diagramas de líneas ofrecen una visión clara de la dinámica de la respuesta. La vía intraperitoneal mostró un efecto máximo inicial que fue disminuyendo hasta el vigésimo día. A partir de entonces, un porcentaje de disminución del 20-25% se mantuvo durante por lo menos 120 días (Figura 22). De forma distinta, la vía subcutánea presentó un efecto mínimo inicial que aumentó hasta el vigésimo día, momento en el que se alcanzó una meseta de reducción del 20-25% que se mantuvo hasta por lo menos el día 120 (Figura 23).

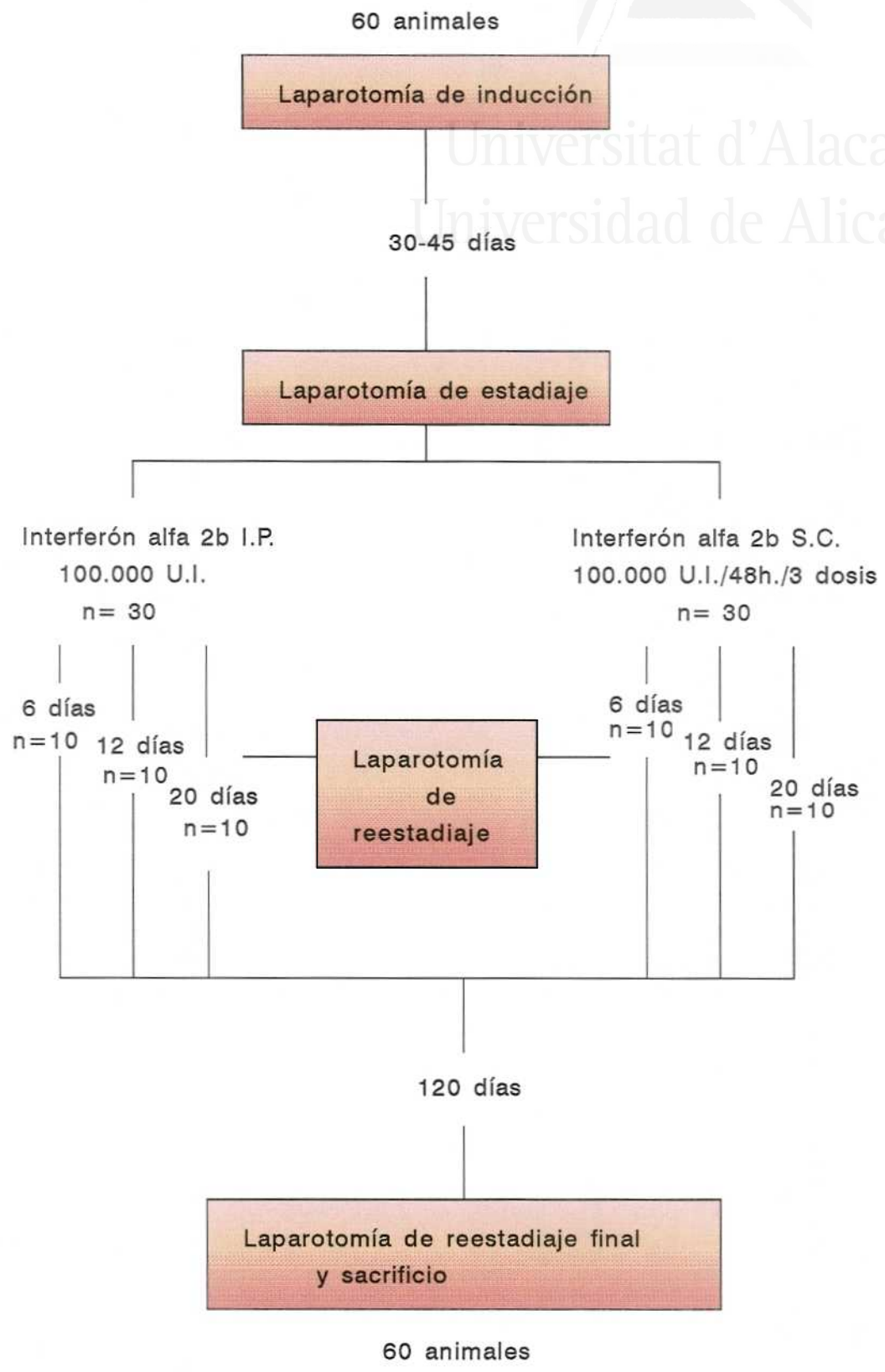


Figura 19. Representación esquemática del experimento 2.

Tabla 28. Grupo C (animales tratados tras el estadiaje con una dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b intraperitoneal). Distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado en las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento).

GRADO DE CRECIMIENTO	Estadiaje		Final		P Fisher
	N	(%)	N	(%)	
0	13	(10.83)	29	(24.17)	p<0.01
I	4	(3.33)	10	(8.33)	NS
II	49	(40.84)	33	(27.50)	p<0.05
III	54	(45.00)	48	(40.00)	NS
Total	120	(100.00)	120	(100.00)	
Mal crec.	17	(14.16)	39	(32.50)	p<0.005
Buen crec.	103	(85.84)	81	(67.50)	p<0.05

Mal crec. : Mal crecimiento
Buen crec. : Buen crecimiento

Tabla 29. Experimento 2. Grupo C (animales tratados tras el estadiaje con una dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b intraperitoneal). Distribución de los implantes por grado adherencial encontrado en las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento).

GRADO ADHERENCIAL	Estadiaje		Final		P Fisher
	N	(%)	N	(%)	
Cero	7	(5.83)	8	(6.67)	NS
Uno	49	(40.83)	43	(35.83)	NS
Dos	36	(30.00)	38	(31.67)	NS
Tres	28	(23.34)	31	(25.83)	NS
Total	120	(100.00)	120	(100.00)	

Tabla 30. Experimento 2. Grupo C (animales tratados tras el estadiaje con una dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b intraperitoneal). Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, en las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento).

	Estadiaje X ± DS	Final X ± DS	P
Grado adherencial	6.80±1.71	7.03±2.23	** NS
Milímetros	19.71±7.81	14.86±7.98	* p<0.001
Grados	9.20±2.28	7.33±3.14	* p<0.001
Suma parámetros	35.48±10.41	28.90±11.16	* p<0.001

** Wilcoxon.

* t-Student.

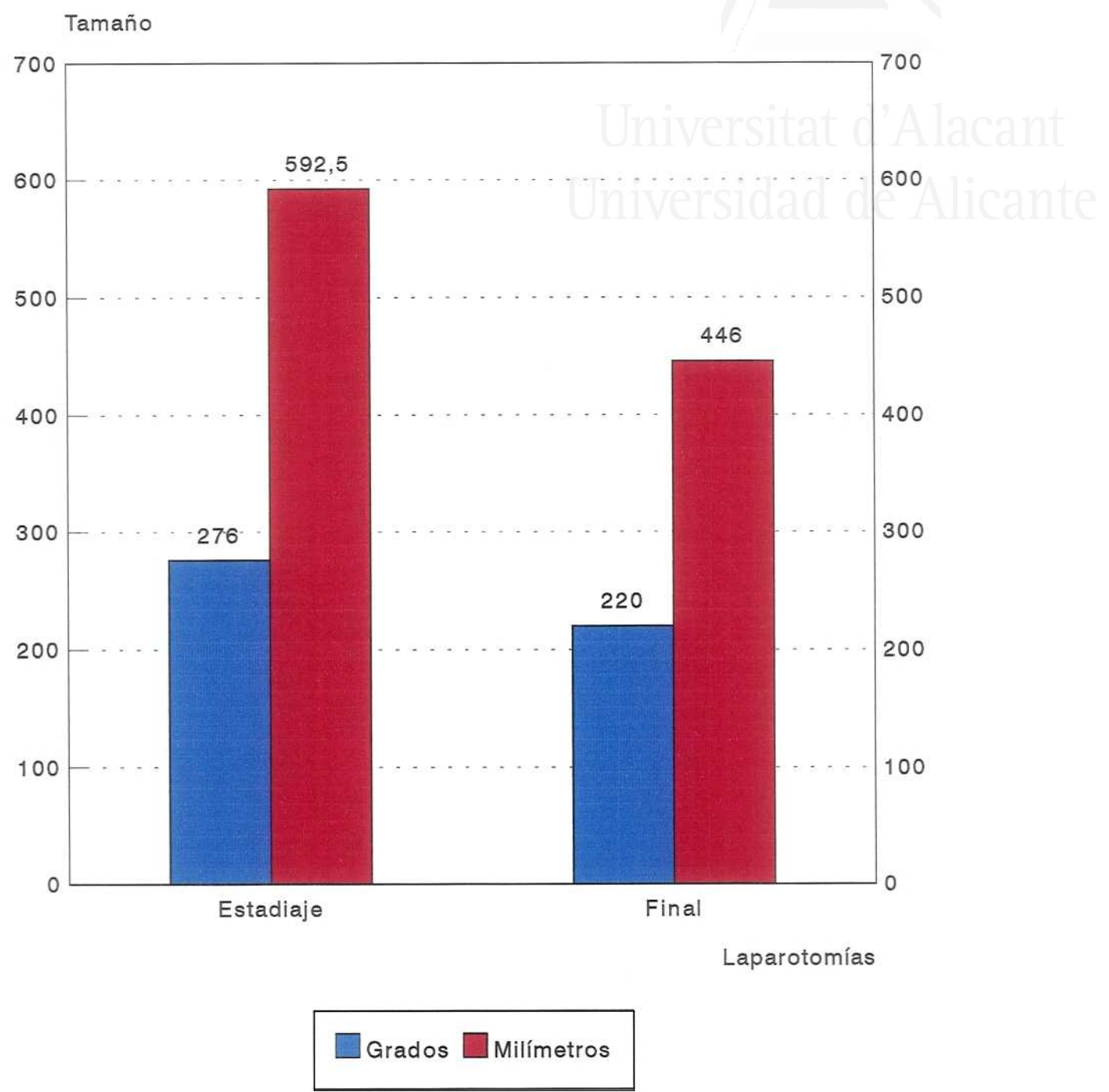


Figura 20. Experimento 2. Grupo C (animales tratados tras el estadiaje con una dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b intraperitoneal). Modificación de la suma del tamaño de todos los implantes, antes (estadiaje) y después del tratamiento (final).

Tabla 31. Experimento 2. Grupo D (animales tratados tras el estadiaje con tres dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado en las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento).

GRADO DE CRECIMIENTO	Estadiaje		Final		P Fisher
	N	(%)	N	(%)	
0	13	(10.83)	37	(30.83)	p<0.001
I	10	(8.33)	9	(7.50)	NS
II	43	(35.84)	31	(25.83)	NS
III	54	(45.00)	43	(35.84)	NS
Total	120	(100.00)	120	(100.00)	
Mal crec.	23	(19.16)	46	(38.33)	p<0.01
Buen crec.	97	(80.84)	74	(61.67)	p<0.05

Mal crec. : Mal crecimiento
Buen crec.: Buen crecimiento



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 32. Experimento 2. Grupo D (animales tratados tras el estadiaje con tres dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado adherencial encontrado en las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento).

GRADO ADHERENCIAL	Estadiaje		Final		P Fisher
	N	(%)	N	(%)	
Cero	7	(5.83)	8	(6.67)	NS
Uno	46	(38.33)	63	(52.50)	p<0.05
Dos	42	(35.00)	34	(28.33)	NS
Tres	25	(20.84)	15	(12.50)	p<0.05
Total	120	(100.00)	120	(100.00)	



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 33. Experimento 2. Grupo D (animales tratados tras el estadiaje con tres dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, en las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento).

	Estadiaje X ± DS	Final X ± DS	P
Grado adherencial	6.23±2.06	5.93±1.70	** NS
Milímetros	18.08±9.20	13.98±9.49	* p<0.001
Grados	8.73±2.76	6.73±3.85	* p<0.001
Suma parámetros	32.98±12.29	26.61±13.96	* p<0.001

** Wilcoxon.

* t-Student.

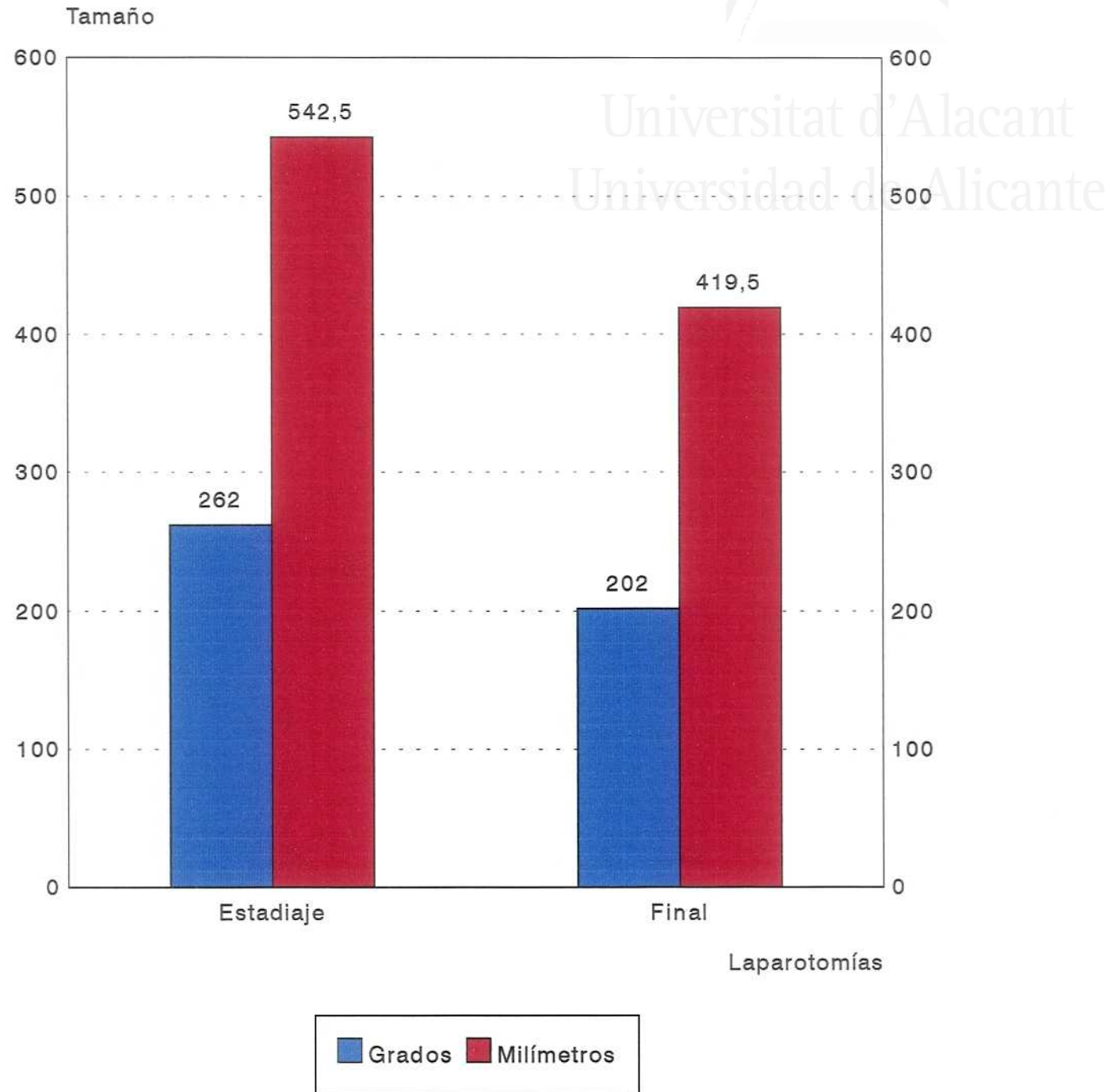


Figura 21. Experimento 2. Grupo D (animales tratados tras el estadaje con tres dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas. Modificación de la suma del tamaño de todos los implantes, antes (estadaje) y después del tratamiento (final).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 34. Experimento 2. Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, en el momento de la laparotomía final. Comparación entre los grupos A (grupo control), C (Interferón intraperitoneal tras estadiaje en pauta corta) y D (Interferón subcutáneo tras estadiaje en pauta corta).

	Grupo C	Grupo A	Grupo D
	X ± DS	X ± DS	X ± DS
Grado adherencial	* 7.03±2.23	7.61±2.04	** 5.93±1.70
Milímetros	14.86±7.98	* 17.62±7.51	* 13.98±9.49
Grados	7.33±3.14	* 8.93±2.51	* 6.73±3.85
Suma parámetros	28.90±11.16	* 34.17±10.94	* 26.61±13.96

Newman-Keuls: * p<0.05, ** p<0.001

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 35. Experimento 2. Modificación de la suma del tamaño en grados y milímetros de los implantes, al sexto, duodécimo y vigésimo días postratamiento, en los animales del grupo C (Una dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b intraperitoneal, tras el estadiaje).

6° DIA	Estadiaje Ê	Reestadiaje Ê	Modificación %
Grados	94	67	- 28.73
Milímetros	194	116.5	- 39.95
12° DIA			
Grados	86	69	- 19.77
Milímetros	191.5	127.5	- 33.42
20° DIA			
Grados	96	70.5	- 20.79
Milímetros	206	165	- 19.91

Ê: Suma de los valores individuales de cada uno de los 40 implantes colocados en los 10 animales de cada grupo.

Tabla 36. Experimento 2. Modificación de la suma del tamaño en grados y milímetros de los implantes, al sexto, duodécimo y vigésimo días postratamiento, en los animales del grupo D (3 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas, tras el estadiaje).

6° DIA	Estadiaje Ê	Reestadiaje Ê	Modificación %
Grados	89	81	- 8.99
Milímetros	190	165.5	- 12.90
12° DIA			
Grados	84	68	- 19.05
Milímetros	156.5	135	- 13.74
20° DIA			
Grados	89	70.5	- 20.79
Milímetros	196	161.5	- 17.61

Ê: Suma de los valores individuales de cada uno de los 40 implantes colocados en los 10 animales de cada grupo.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

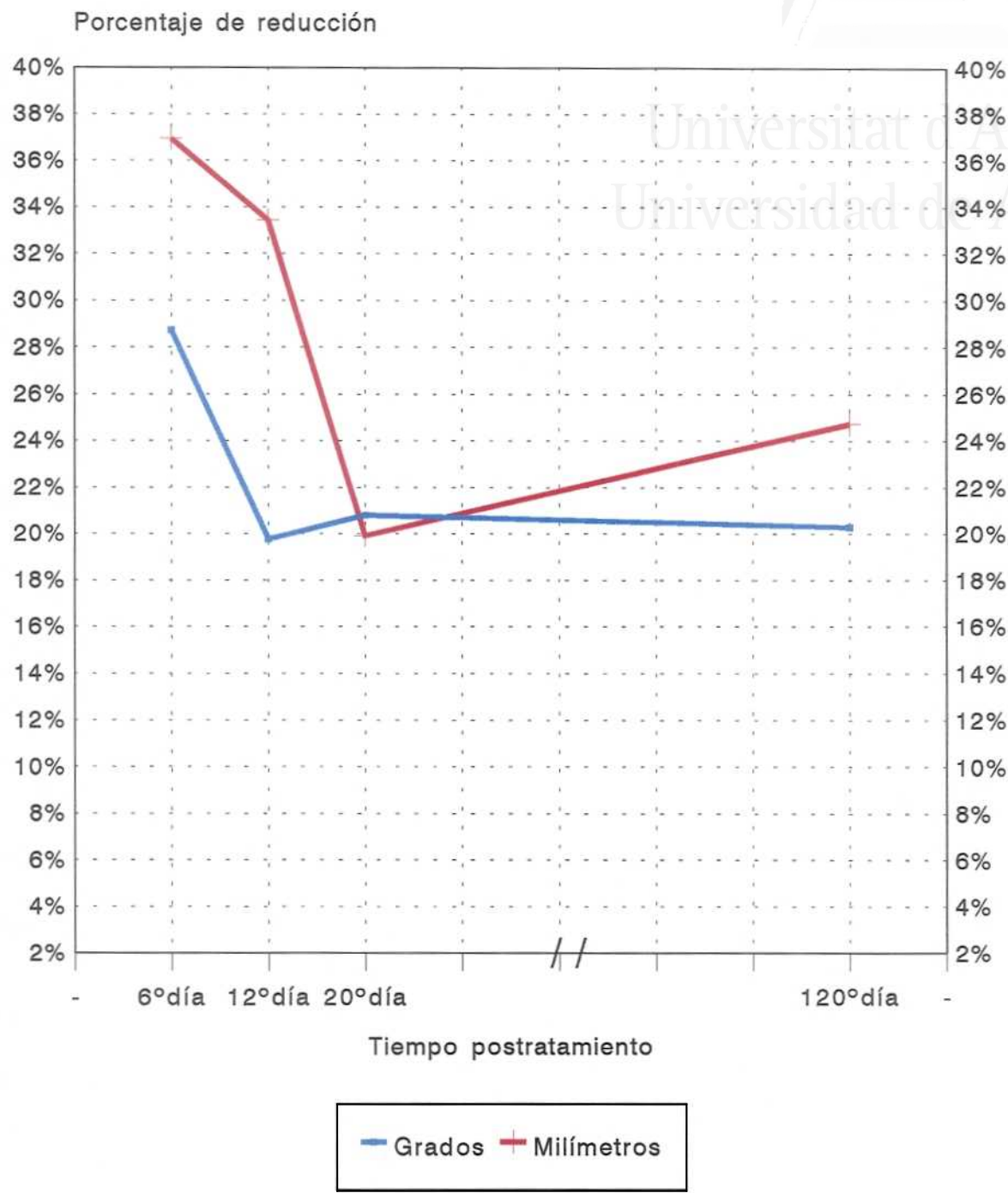


Figura 22. Experimento 2. Porcentaje de reducción de la suma del tamaño de los implantes con relación al tiempo transcurrido postratamiento, en los animales del grupo C (Una dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b intraperitoneal, tras el estadiaje).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

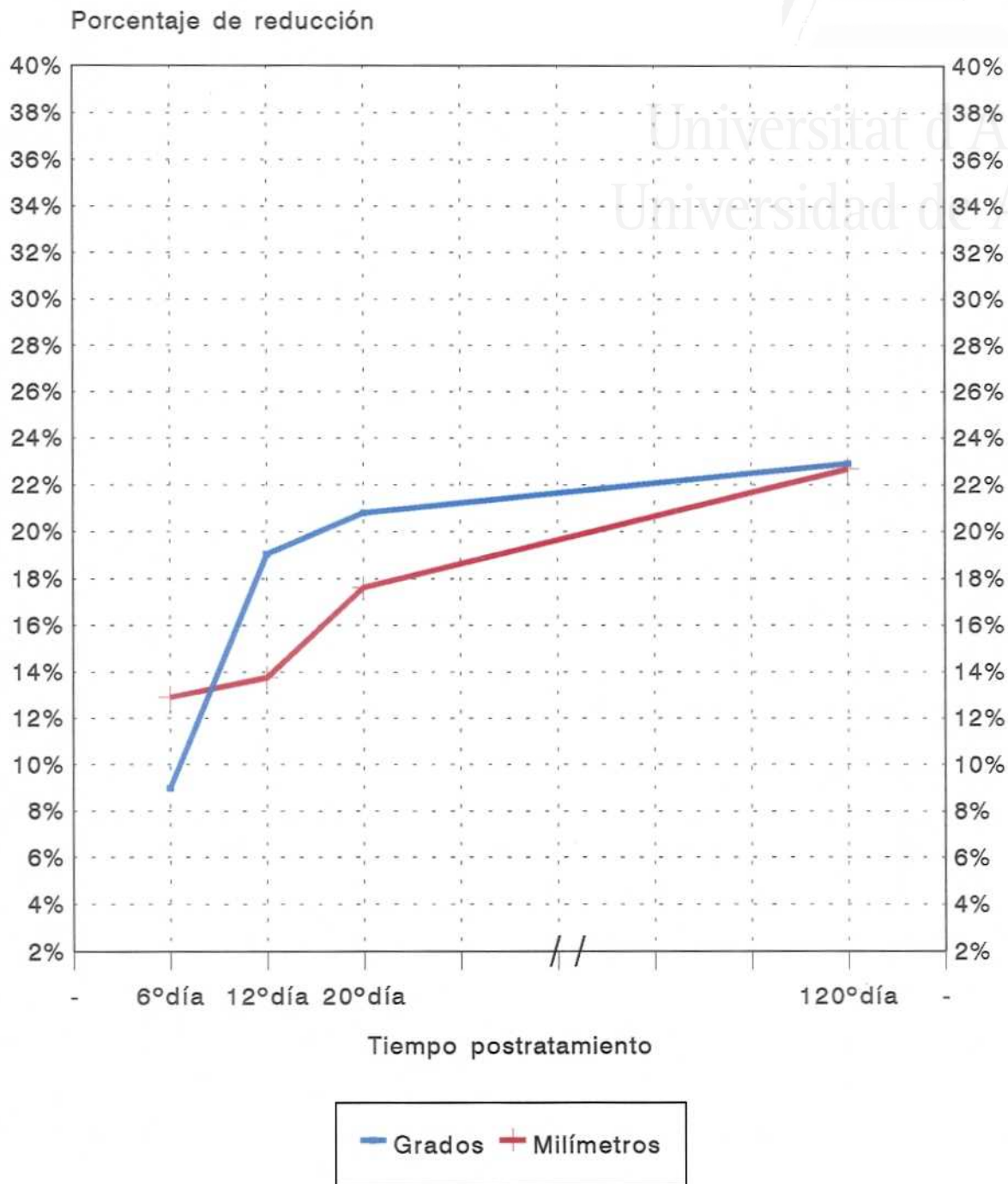


Figura 23. Experimento 2. Porcentaje de reducción de la suma del tamaño de los implantes con relación al tiempo transcurrido postratamiento, en los animales del grupo D (tres dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas, tras el estadiaje).

Tercer experimento: Investigación del efecto de una pauta larga de tratamiento con Interferón alfa 2b.

En la figura 24 aparece una representación esquemática de la forma en que se llevó a cabo el tercer experimento.

Los resultados hallados en el grupo E (animales tratados tras el estadiaje con 15 dosis estándar de Interferón alfa 2b por vía subcutánea) fueron los siguientes:

Al comparar la distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado antes del tratamiento (estadiaje), 30 días tras la finalización del mismo (reestadiaje) y 60 días más tarde (final), se observa una tendencia importante hacia la disminución de grado por efecto de la terapia (Tabla 37). Las diferencias entre lo encontrado antes (estadiaje) y después del tratamiento (reestadiaje y final) fueron significativas, sin embargo no se alcanzó diferencia significativa entre estas dos últimas valoraciones.

La tabla 38 trata de reflejar la dinámica de modificación en el grado de los implantes desde la valoración previa al tratamiento hasta la valoración final postratamiento. Aparecen en esta tabla destacados los implantes que tuvieron el mismo grado inicial (antes del tratamiento) y final (después del tratamiento). Apreciamos que los dos implantes con grado 0 inicial permanecieron finalmente en dicho grado. Los dos implantes con grado I pasaron a grado 0. Casi el 70% de los de grado II pasaron a grados inferiores, la mayoría a grado 0. El 62.5% de los implantes con grado III disminuyeron finalmente de grado.

El grado adherencial por implante no sufrió modificación a lo largo del experimento (Tabla 39), como tampoco lo hizo al ser evaluado por animal (Tabla 40).

Cuando consideramos la endometriosis por animal, el tamaño medio y la suma de tamaño y grado adherencial medios sufrieron importantes disminuciones tras la administración del tratamiento. La tabla 40 revela que hubo en este sentido diferencias altamente significativas entre lo hallado en la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento) y lo hallado en las laparotomías de reestadiaje y final (30 y 90 días tras la finalización de la terapia respectivamente), pero no al comparar estas dos últimas entre sí.

Con la pauta de tratamiento empleada en este grupo E, el tamaño global de la endometriosis, considerado por la suma de los diámetros mayores de los 60 implantes, disminuyó en un 30.63% a los 30 días de finalizada la terapia (laparotomía de reestadiaje), y en un 42.80% 60 días más tarde (laparotomía final). La figura 25 representa de forma gráfica estos resultados.

En la tabla 41 comparamos los grupos A (grupo control), D (3 dosis de Interferón alfa 2b subcutáneas) (pauta corta) y E (15 dosis de Interferón alfa 2b subcutáneas) (pauta larga) en cuanto al grado adherencial medio por animal, el tamaño medio en milímetros y grados, y la suma de los tres parámetros, encontrados en la laparotomía final. Las diferencias entre los distintos grupos fueron notorias en estos aspectos. El grado adherencial medio en las ratas que se trataron con pauta corta fue inferior que en las que recibieron pauta larga ($p < 0.005$) y que las pertenecientes al grupo control ($p < 0.001$). Entre los dos últimos grupos no hubo diferencias significativas. Los grupos tratados (D y E) presentaron tamaños medios de endometriosis por animal significativamente menores que el grupo control. Existieron diferencias en el tamaño medio de la endometriosis por animal entre los grupos tratados con una u otra pauta, siendo menores los valores encontrados en el grupo E, pero sólo las diferencias halladas en el tamaño medio en milímetros alcanzaron significación estadística ($p < 0.05$).

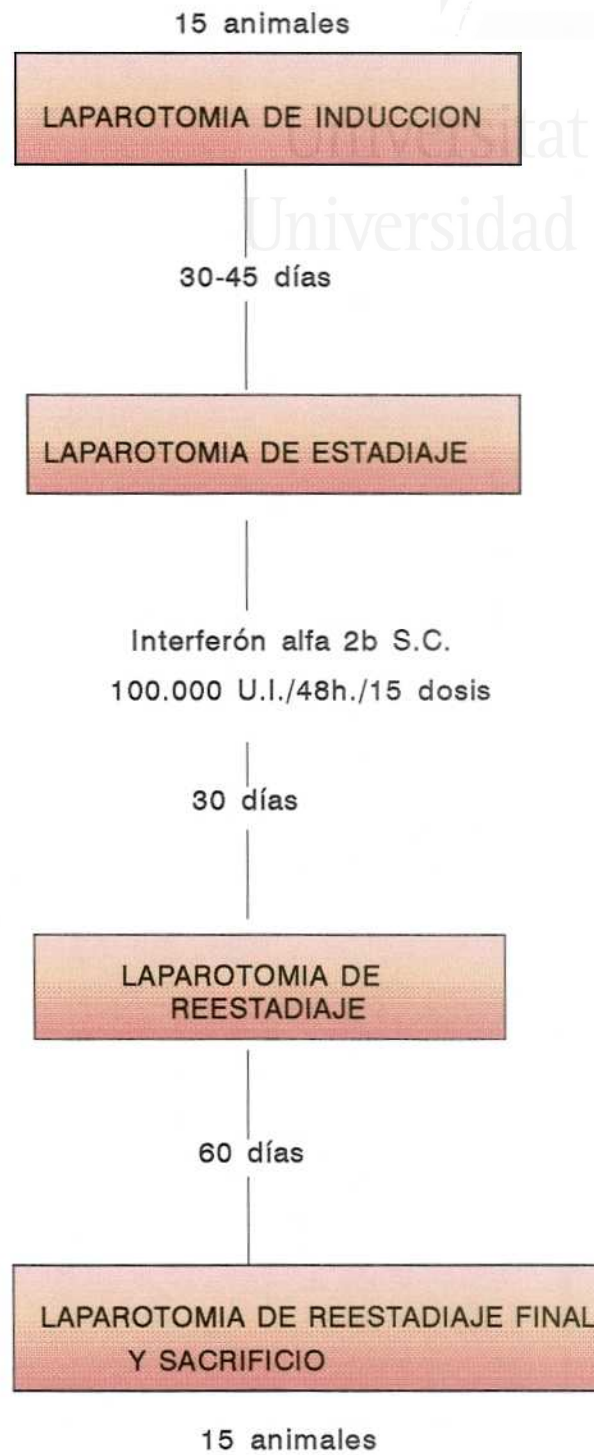


Figura 24. Representación esquemática del experimento 3.

Tabla 37. Experimento 3. Grupo E (animales tratados tras el estadiaje con 15 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado de crecimiento en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días tras la finalización del tratamiento) y final (90 días tras la finalización del tratamiento).

GRADO DE CRECIMIENTO	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
0	*** 2	(3.33)	** 16	(26.67)	24	(40.00)
I	2	(3.33)	* 10	(16.67)	7	(11.67)
II	* 32	(53.34)	22	(36.66)	15	(25.00)
III	24	(40.00)	* 12	(20.00)	14	(23.33)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

Fisher: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 38. Experimento 3. Grupo E (animales tratados tras el estadiaje con 15 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Modificación del grado de los implantes desde la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento) hasta la laparotomía final (90 días tras la finalización del tratamiento).

GRADO INICIAL	GRADO FINAL								TOTAL N (%)	
	0		I		II		III			
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)		
0	2	(100.0)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	2	(3.33)
I	2	(100.0)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	2	(3.33)
II	19	(59.37)	3	(9.37)	5	(15.63)	5	(15.63)	32	(53.34)
III	1	(4.17)	4	(16.67)	10	(41.66)	9	(37.50)	24	(40.00)
TOTAL	24	(40.00)	7	(11.67)	15	(25.00)	14	(23.33)	60	(100.00)

Fisher: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ entre los totales.

■ Implantes que permanecieron inalterados.

Tabla 39. Experimento 3. Grupo E (animales tratados con 15 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado adherencial en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días tras la finalización del tratamiento) y final (90 días tras la finalización del tratamiento).

GRADO ADHERENCIAL	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Cero	2	(3.33)	2	(3.33)	0	(0.00)
Uno	20	(33.33)	23	(38.33)	23	(38.33)
Dos	20	(33.33)	18	(30.00)	22	(36.67)
Tres	18	(30.01)	17	(28.34)	15	(25.00)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

Fisher NS.

Tabla 40. Experimento 3. Grupo E (animales tratados con 15 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal en cada una de las tres laparotomías (Estadíaaje: antes del tratamiento. Reestadíaaje: 30 días tras la finalización del tratamiento. Final: 90 días tras la finalización del tratamiento).

	Estadíaaje X ± DS	Reestadíaaje X ± DS	Final X ± DS
Grado adherencial	7.60±2.38	7.33±1.29	7.46±1.45
Milímetros	* 16.43±3.63	* 10.23±5.41	9.40±5.96
Grados	* 9.20±1.20	* 6.00±2.97	5.26±3.26
Suma parámetros	** 33.23±6.65	** 23.56±9.21	22.40±10.59

* $p < 0.0001$, ** $p < 0.00001$

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

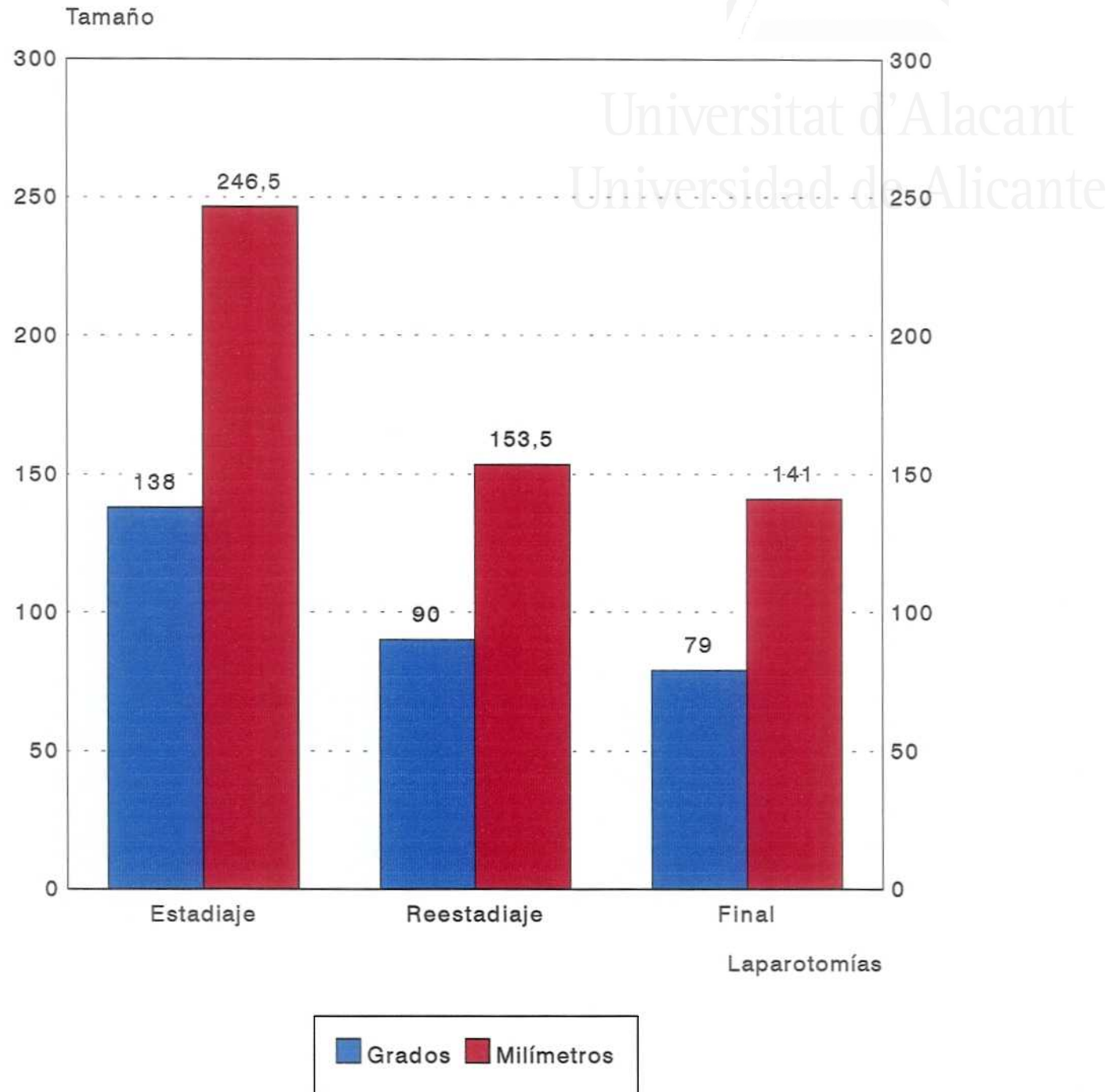


Figura 25. Experimento 3. Grupo E (animales tratados con 15 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Modificación de la suma del tamaño de todos los implantes, desde la valoración realizada antes del tratamiento (estadiaje), 30 días tras la finalización del tratamiento (reestadiaje) y 90 días tras la finalización del tratamiento (final).

Tabla 41. Experimento 3. Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, en el momento de la laparotomía final. Comparación entre los grupos A (grupo control) (experimento 1), D (3 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas) (experimento 2) y E (15 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas) (experimento 3).

		Grupo E	Grupo A		Grupo D
		X ± DS	X ± DS		X ± DS
Grado adherencial	**	7.46±1.45	7.61±2.04	***	5.93±1.70
Milímetros	*	9.40±5.96	*** 17.62±7.51	*	13.98±9.49
Grados		5.26±3.26	*** 8.93±2.51	*	6.73±3.85
Suma parámetros		22.40±10.59	** 34.17±10.94	*	26.61±13.96

* p<0.05. ** p<0.005. *** p<0.001.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Cuarto experimento: Identificación de la dosis más efectiva

Una representación esquemática de la forma en que se ejecutó este cuarto experimento se muestra en la figura 26.

Respecto al grupo F (animales tratados tras el estadiaje con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b por vía subcutánea), los resultados hallados fueron los siguientes:

La distribución de los implantes por grado de crecimiento, tendió a la reducción de grado, observándose diferencias significativas entre lo encontrado en la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento) y lo hallado en las laparotomías de reestadiaje y final (después del tratamiento) (Tabla 42). Sin embargo, no hubo diferencias en este sentido entre las dos últimas laparotomías.

Al analizar la dinámica de modificación del grado de los implantes desde la valoración inicial (antes del tratamiento) hasta la final (después del tratamiento) se aprecia lo siguiente (Tabla 43). Ningún implante aumentó de grado después de recibido el tratamiento. El 55% de las vesículas con grado II inicial y el 90% de las de grado III disminuyeron finalmente de grado, alcanzando grado 0 (desaparición macroscópica) el 36% y el 20% respectivamente.

La distribución de los implantes por grado adherencial no se modificó por efecto del tratamiento (Tabla 44), como tampoco se modificó el grado adherencial medio por animal (Tabla 45). Esta última tabla refleja la disminución del tamaño medio de los implantes por animal que ocurrió después del tratamiento. No se registró cambio significativo en el tamaño medio de la endometriosis por animal entre las laparotomías de reestadiaje (30 días postratamiento) y la final (90 días postratamiento).

Los porcentajes de reducción del tamaño global de la endometriosis

en los animales de este grupo, obtenidos por la suma del tamaño en grados y en milímetros de todas las vesículas, fueron a los 30 días de finalizada la terapia (reestadiaje) del 41.27 % (grados) y 44.63 % (milímetros). Sesenta días más tarde la reducción era de 47.61 % (grados) y 50.57 % (milímetros). Todo esto se observa gráficamente en el histograma de la figura 27.

Respecto al grupo G (animales tratados tras el estadiaje con 15 dosis de 200.000 U. de Interferón alfa 2b por vía subcutánea), los resultados hallados fueron los siguientes:

La distribución de los implantes por grado de crecimiento en cada una de las laparotomías (estadiaje, reestadiaje y final) se inclinó hacia la reducción de grado, siendo las diferencias significativas entre lo encontrado previa (estadiaje) y posteriormente al tratamiento (reestadiaje y final) (Tabla 46). Del mismo modo que en el grupo anterior, no hubo diferencias en este sentido entre las dos últimas laparotomías.

La tabla 47, que estudia la modificación del grado de los implantes desde la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento) hasta la laparotomía final (después del tratamiento), revela lo siguiente. Cinco implantes pasaron a grado III después de haber recibido tratamiento, uno desde el grado I y cuatro desde el grado II. Casi el 60 % de las vesículas de grado II y el 83 % de las de grado III, redujeron su grado por efecto de la terapia, llegando el 41 % y el 5 % a grado 0 (desaparición macroscópica) respectivamente.

Ni la distribución de los implantes por grado adherencial (Tabla 48), ni el grado adherencial medio por animal (Tabla 49) presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar lo encontrado en cada una de las tres laparotomías. En la tabla 49 también se aprecia una importante reducción del tamaño medio de la endometriosis después del tratamiento (diferencias altamente significativas), aunque entre las laparotomías de reestadiaje (30 días postratamiento) y de reestadiaje final (90 días postratamiento) no hubiese cambio.

La suma del tamaño de todas las vesículas en grados y milímetros, disminuyó al realizar el reestadiaje, con respecto a la valoración previa al tratamiento (estadiaje), un 35.20% y 35.01 % respectivamente. Al realizar la evaluación final, esta reducción era del 37.60 % y 37.03%, en grados y milímetros respectivamente. La figura 28 plasma estos resultados de forma gráfica.

Finalizada la exposición de los resultados obtenidos por efecto de pautas largas de Interferón alfa 2b subcutáneo a dosis de 50.000 U. (grupo F) y 200.000 U. (grupo G), realizamos, para identificar la dosis más efectiva, una comparación múltiple entre los grupos E (15 dosis de 100.000 U. de Interferón alfa 2b), F (15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b) y G (15 dosis de 200.000 U. de Interferón alfa 2b) respecto al grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados, y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal a los 30 días de finalizado el tratamiento (laparotomía de reestadiaje). No hubo diferencias significativas entre los tres grupos (Tabla 50). Una comparación similar a la anterior, realizada a los 90 días de finalizado el tratamiento (laparotomía final) arrojó el mismo resultado (Tabla 51). Aunque el grupo F (50.000 U.) presentó los menores valores medios por animal, las diferencias no alcanzaron significación estadística.

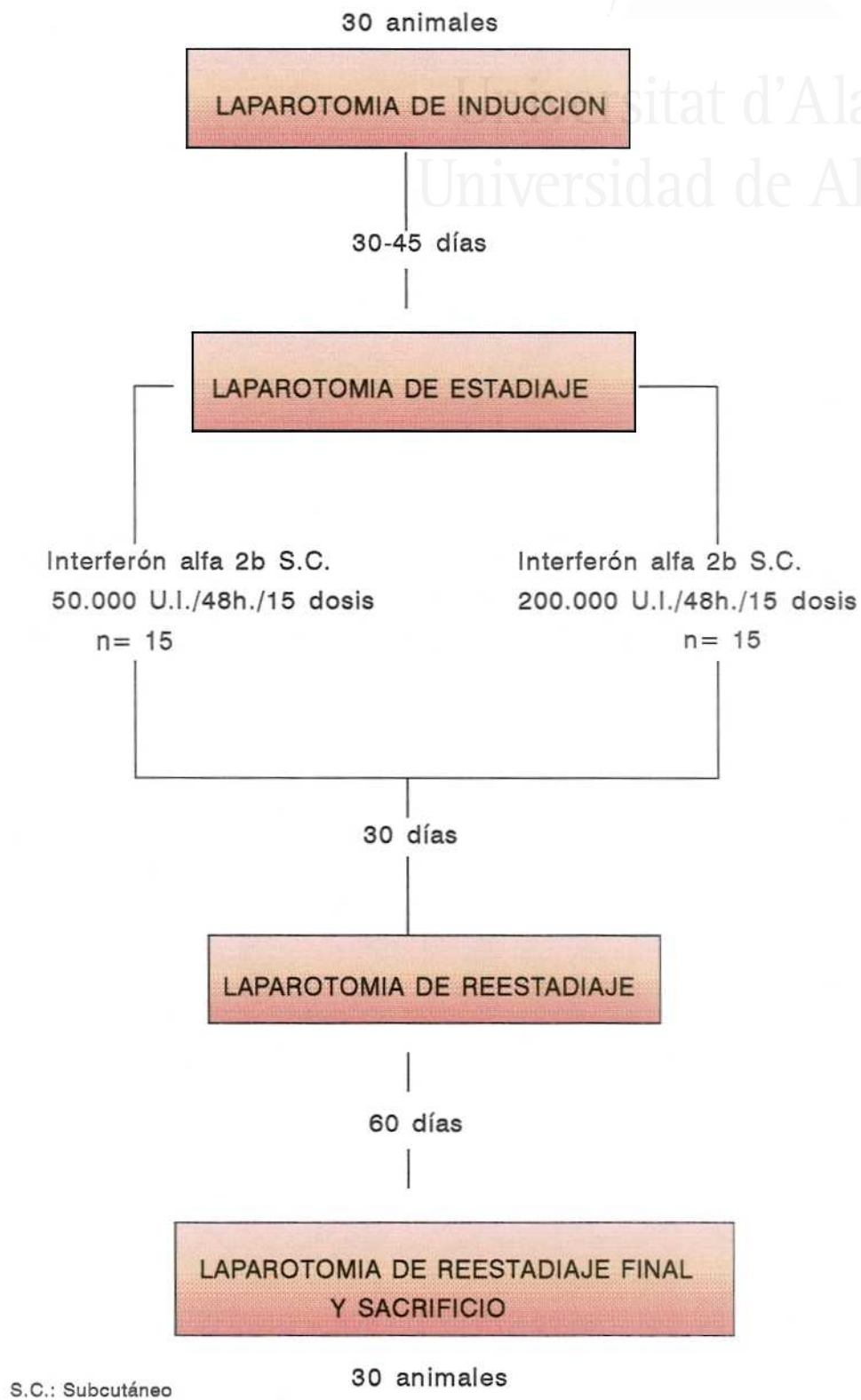


Figura 26. Representación esquemática del experimento 4.

Tabla 42. Experimento 4. Grupo F (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado de crecimiento en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días tras la finalización del tratamiento) y final (90 días tras la finalización del tratamiento).

GRADO DE CRECIMIENTO	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
0	** 7	(11.67)	* 19	(31.67)	23	(38.33)
I	** 0	(0.00)	*** 11	(18.33)	10	(16.67)
II	33	(55.00)	27	(45.00)	25	(41.67)
III	**** 20	(33.33)	*** 3	(5.00)	2	(3.33)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

Fisher: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0005$.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 43. Experimento 4. Grupo F (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Modificación del grado de los implantes desde la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento) hasta la laparotomía final (90 días tras la finalización del tratamiento).

GRADO INICIAL	GRADO FINAL								TOTAL N (%)
	0		I		II		III		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
0	7	(100.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	7 (11.67)
I	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	0 (0.00)
II	12	(36.36)	6	(18.18)	15	(45.46)	0	(0.00)	33 (55.00)
III	4	(20.00)	4	(20.00)	10	(50.00)	2	(10.00)	20 (33.33)
TOTAL	23	(38.33)	10	(16.67)	25	(41.67)	2	(3.33)	60 (100.00)
	*		*				**		

Fisher: * $p < 0.005$, ** $p < 0.0005$ entre los totales.

■ Implantes que permanecieron inalterados.

Tabla 44. Experimento 4. Grupo F (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado adherencial en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días tras la finalización del tratamiento) y final (90 días tras la finalización del tratamiento).

GRADO ADHERENCIAL	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Cero	2	(3.33)	0	(0.00)	1	(1.67)
Uno	25	(41.67)	28	(46.66)	22	(36.67)
Dos	15	(25.00)	16	(26.67)	19	(31.66)
Tres	18	(30.00)	16	(26.67)	18	(30.00)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

Diferencias NS

Tabla 45. Experimento 4. Grupo F (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal, en cada una de las tres laparotomías.

	Estadiaje	Reestadiaje	Final
	X ± DS	X ± DS	X ± DS
Grado adherencial	7.26±1.86	7.20±2.24	7.60±1.50
Milímetros	*** 17.56±4.56	*** 8.06±2.91	7.20±3.13
Grados	** 8.40±2.29	* 4.93±1.75	4.40±1.93
Suma parámetros	** 33.23±8.21	* 20.20±5.98	19.20±5.10

* $p < 0.0001$, ** $p < 0.000001$, *** $p < 0.0000001$.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

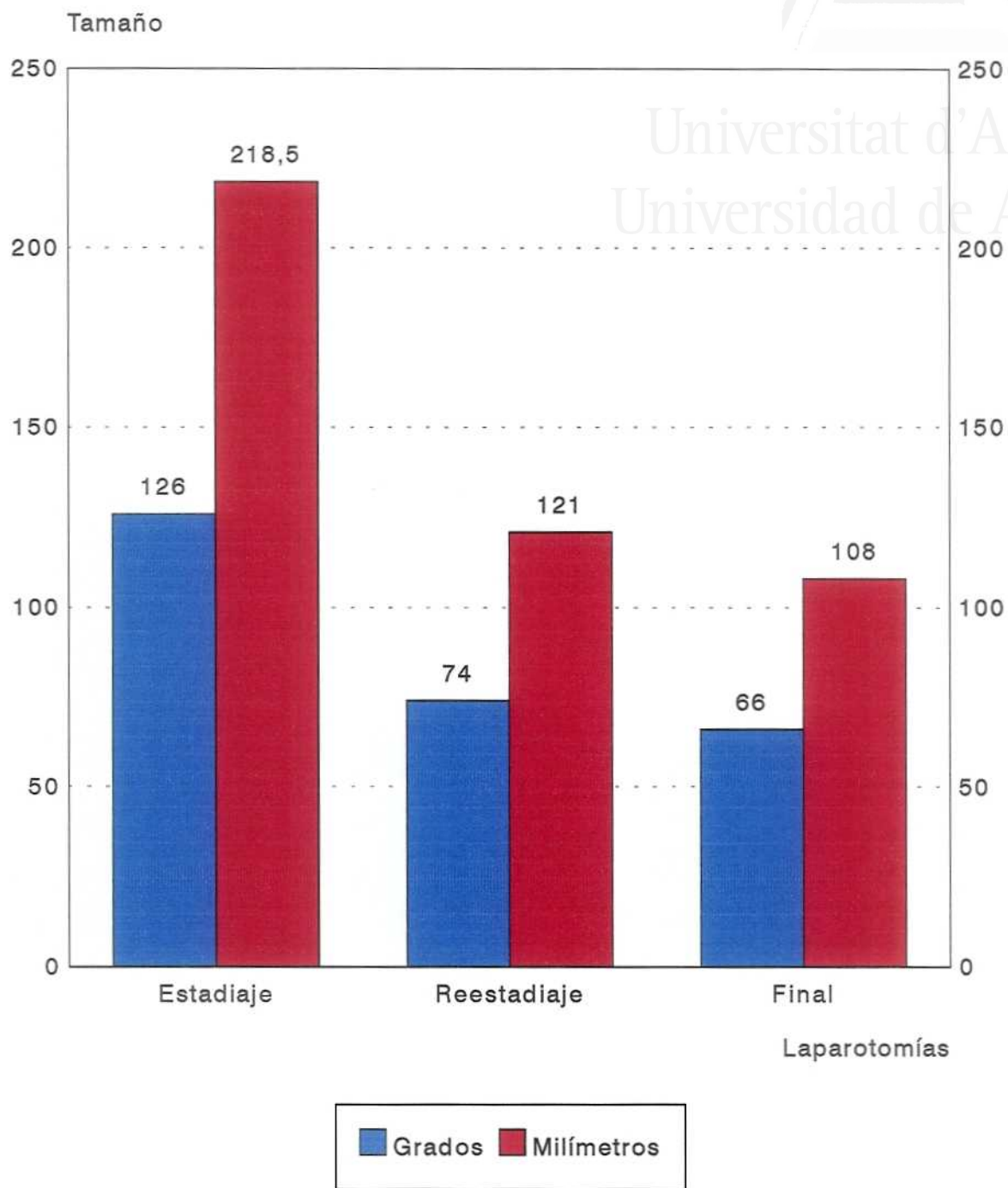


Figura 27. Experimento 4. Grupo F (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Modificación de la suma del tamaño de todos los implantes desde la valoración realizada antes del tratamiento (estadiaje), 30 días tras la finalización del tratamiento (reestadiaje) y 90 días tras la finalización del tratamiento (final).

Tabla 46. Experimento 4. Grupo G (animales tratados con 15 dosis de 200.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado de crecimiento encontrado en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días postratamiento) y final (90 días postratamiento).

GRADO DE CRECIMIENTO	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
0	** 5	(8.33)	* 16	(26.67)	22	(36.67)
I	3	(5.00)	* 10	(16.67)	7	(11.67)
II	34	(56.67)	31	(51.66)	23	(38.33)
III	* 18	(30.00)	** 3	(5.00)	8	(13.33)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

* Fisher $p < 0.05$

** Fisher $p < 0.005$

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 47. Experimento 4. Grupo G (animales tratados con 15 dosis de 200.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Modificación del grado de los implantes desde la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento) hasta la laparotomía final (90 días postratamiento).

GRADO INICIAL	GRADO FINAL								TOTAL N (%)
	0		I		II		III		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
0	5	(100.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	5 (8.33)
I	2	(66.67)	0	(0.00)	0	(0.00)	1	(33.33)	3 (5.00)
II	14	(41.17)	6	(17.65)	10	(29.41)	4	(11.77)	34 (56.67)
III	1	(5.55)	1	(5.55)	13	(72.23)	3	(16.67)	18 (30.00)
TOTAL	22	(36.67)	7	(11.67)	23	(38.33)	8	(13.33)	60 (100.00)
	**						*		

Fisher: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. entre los totales.

■ Implantes con el mismo grado inicial y final.

Tabla 48. Experimento 4. Grupo G (animales tratados con 15 dosis de 200.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Distribución de los implantes por grado adherencial en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días postratamiento) y final (90 días postratamiento).

GRADO AHERENCIAL	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Cero	4	(6.67)	5	(8.33)	3	(5.00)
Uno	25	(41.67)	25	(41.67)	23	(38.34)
Dos	18	(30.00)	15	(25.00)	17	(28.33)
Tres	13	(21.66)	15	(25.00)	17	(28.33)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

Fisher: Diferencias NS.

Tabla 49. Experimento 4. Grupo G (animales tratados con 15 dosis de 200.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal, en cada una de las tres laparotomías.

	Estadiaje X ± DS	Reestadiaje X ± DS	Final X ± DS
Grado adherencial	6.66±2.16	6.73±2.05	7.20±1.82
Milímetros	** 16.23±5.31 ***	8.60±4.91	8.33±5.56
Grados	** 8.33±2.55 ***	5.40±2.89	5.20±3.23
Suma parámetros	* 31.90±9.45 ***	20.73±9.35	20.73±10.07

* $p < 0.0005$, ** $p < 0.0001$, *** $p < 0.00001$.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

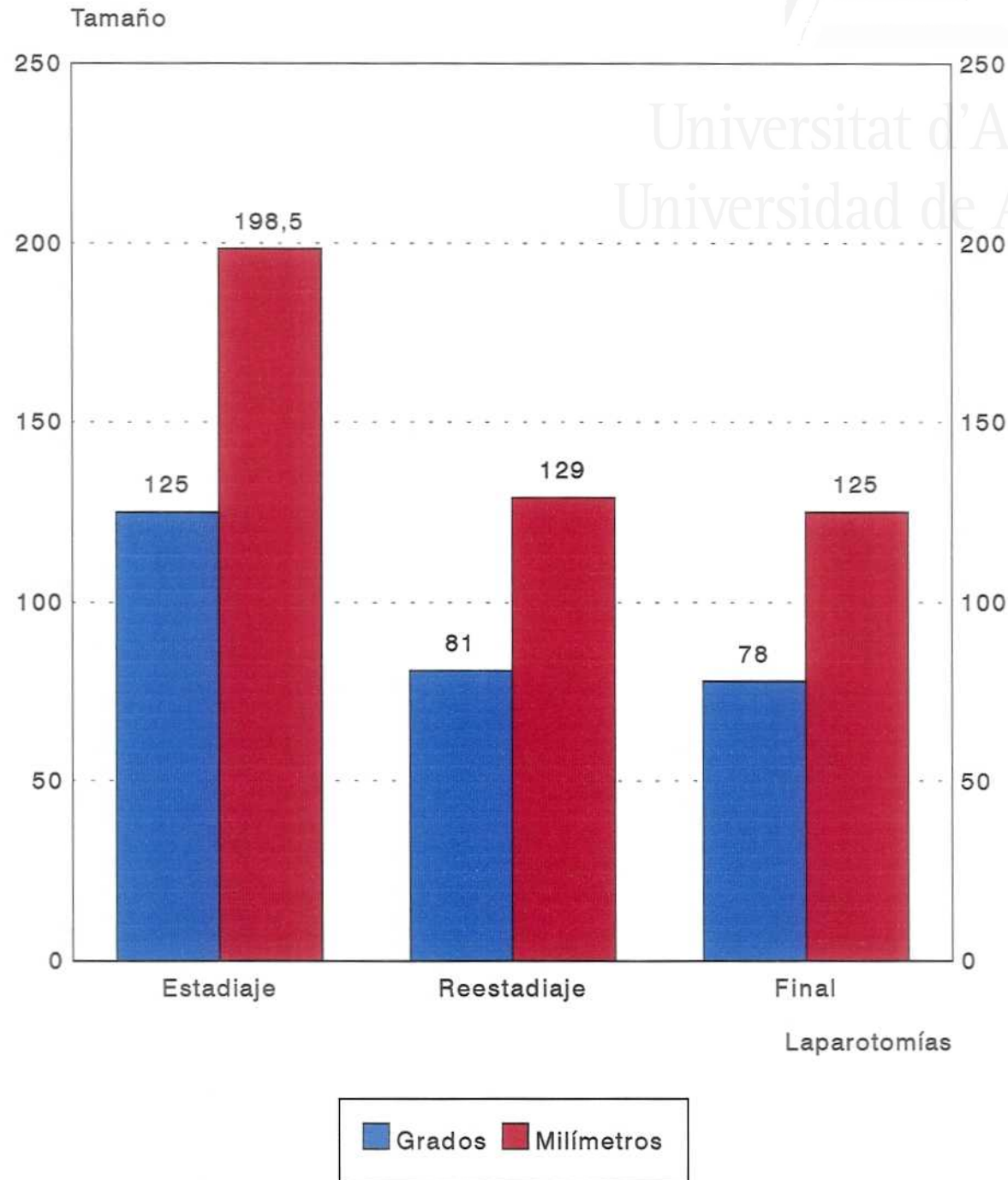


Figura 28. Experimento 4. Grupo G (animales tratados con 15 dosis de 200.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Modificación de la suma del tamaño de todos los implantes desde la valoración realizada antes del tratamiento (estadiaje) hasta la valoración realizada a los 30 días postratamiento (reestadiaje) y la realizada a los 90 días de finalizado el mismo (final).

Tabla 50. Experimento 4. Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, en el momento de la laparotomía de reestadiaje. Comparación entre los animales tratados con 15 administraciones de INF alfa2b SC., a dosis de 50.000 (grupo F), 100.000 (grupo E) y 200.000 U. (grupo G) respectivamente.

	Grupo E X \pm DS	Grupo F X \pm DS	Grupo G X \pm DS
Grado adherencial	7.33 \pm 1.29	7.20 \pm 2.24	6.73 \pm 2.05
Milímetros	10.23 \pm 5.41	8.06 \pm 2.91	8.60 \pm 4.91
Grados	6.00 \pm 2.97	4.93 \pm 1.75	5.40 \pm 2.89
Suma parámetros	23.56 \pm 9.21	20.20 \pm 5.98	20.73 \pm 9.35

Diferencias NS.

Tabla 51. Experimento 4. Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, en el momento de la laparotomía final. Comparación entre los animales tratados con 15 administraciones de INF alfa2b SC., a dosis de 50.000 (grupo F), 100.000 (grupo E) y 200.000 U. (grupo G) respectivamente.

	GrupoE X ± DS	GrupoF X ± DS	GrupoG X ± DS
Grado adherencial	7.46±1.45	7.60±1.50	7.20±1.82
Milímetros	9.40±5.96	7.20±3.13	8.33±5.56
Grados	5.26±3.26	4.40±1.93	5.20±3.23
Suma parámetros	22.40±10.59	19.20±5.10	20.73±10.07

Diferencias NS.

Quinto experimento: Investigación del efecto del Interferón beta humano.

Una representación esquemática del quinto experimento tal y como se ejecutó aparece en la figura 29.

Los resultados hallados en el grupo H (animales tratados tras el estadiaje con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón beta humano) fueron los siguientes:

Aplicado el tratamiento, en las laparotomías de reestadiaje y final fue notoria una disminución del grado de crecimiento de los implantes, llegando en los grados 0 y III a ser significativas las diferencias (Tabla 52). Pero como en anteriores experimentos, no hubo diferencias en este sentido entre la evaluación efectuada a los 30 días de finalizado el tratamiento y la efectuada a los 90 días del mismo.

La modificación del grado de los implantes desde la valoración inicial (antes del tratamiento) hasta la valoración final (90 días tras la finalización del tratamiento) se puede apreciar en la tabla 53. Todos los implantes de grado 0 inicial permanecieron finalmente en el mismo grado. Todos los implantes de grado I inicial pasaron finalmente a grado 0. El 50% de las vesículas de grado II y el 73% de las de grado III inicial disminuyeron en la evaluación final, llegando hasta grado 0 (desaparición macroscópica) el 31% y el 18% respectivamente.

Del mismo modo que el Interferón alfa 2b, el Interferón beta no modificó de manera significativa el grado adherencial por implante (Tabla 54), ni el grado adherencial medio por animal (Tabla 55). En esta última tabla se observa también un importante decremento (diferencias altamente significativas) en el tamaño medio de la endometriosis por animal después de haber recibido el tratamiento. A diferencia de anteriores experimentos, existieron diferencias

estadísticamente significativas entre lo encontrado a los 30 días del tratamiento (reestadiaje) y lo encontrado a los 90 días de finalizado el mismo (final), en cuanto al tamaño medio en grados y suma de tamaño y grado adherencial.

Se advirtió en la laparotomía de reestadiaje, con respecto a la valoración previa al tratamiento (estadiaje), una reducción de la suma del tamaño en grados y en milímetros de todas las vesículas del 26.27% y 27.01%, respectivamente. En la laparotomía final, estas reducciones alcanzaron el 35,60% (grados) y el 34.06% (milímetros). En el histograma de la figura 30 se representan gráficamente estos resultados.

La tabla 56 muestra como el tamaño medio en milímetros y grados, obtenido por animal a los 90 días de finalizado el tratamiento (laparotomía final) fue significativamente menor en los animales tratados con 50.000 U. de Interferón alfa2b (grupo F) o con 50.000 U. de Interferón beta (grupo H) que en el grupo de control (grupo A). No existieron diferencias estadísticamente significativas en ese sentido entre ambos tratamientos. El grado adherencial medio no presentó diferencias entre los grupos tratados y el grupo control.

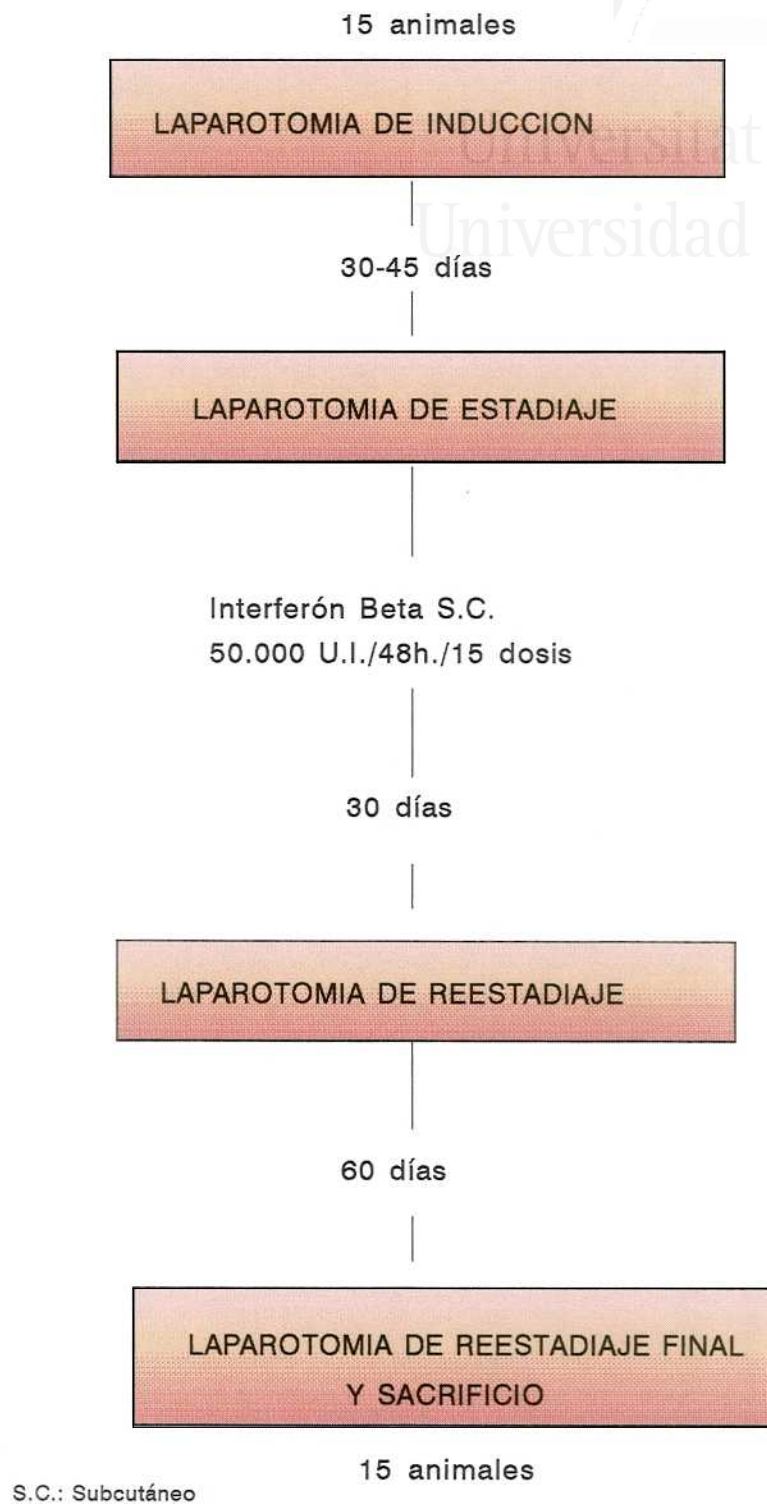


Figura 29. Representación esquemática del experimento 5.

Tabla 52. Experimento 5. Grupo H (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón beta subcutáneas). Distribución de los implantes por grado de crecimiento en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días postratamiento) y final (90 días postratamiento).

GRADO DE CRECIMIENTO	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
0	* 10	(16.66)	* 20	(33.33)	24	(40.00)
I	2	(3.34)	4	(6.67)	6	(10.00)
II	26	(43.33)	25	(41.67)	20	(33.33)
III	* 22	(36.67)	* 11	(18.33)	10	(16.67)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

Fisher : * $p < 0.05$.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 53. Experimento 5. Grupo H (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón beta subcutáneas). Modificación del grado de los implantes desde la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento) hasta la laparotomía final (90 días tras la finalización del tratamiento).

GRADO INICIAL	GRADO FINAL								TOTAL N (%)
	0		I		II		III		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
0	10	(100.0)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	10 (16.66)
I	2	(100.0)	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	2 (3.34)
II	8	(30.77)	5	(19.23)	9	(34.62)	4	(15.38)	26 (43.33)
III	4	(18.18)	1	(4.54)	11	(50.00)	6	(27.28)	22 (36.67)
TOTAL	24	(40.00)	6	(10.00)	20	(33.33)	10	(16.67)	60 (100.00)
	*						*		

Fisher : * $p < 0.05$. entre los totales

■ Implantes que permanecieron inalterados.

Tabla 54. Experimento 5. Grupo H (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón beta subcutáneas). Distribución de los implantes por grado adherencial en las laparotomías de estadiaje (antes del tratamiento), reestadiaje (30 días postratamiento) y final (90 días postratamiento).

GRADO AHERENCIAL	Estadiaje		Reestadiaje		Final	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Cero	5	(8.33)	8	(13.33)	10	(16.67)
Uno	22	(36.67)	16	(26.67)	21	(35.00)
Dos	17	(28.33)	18	(30.00)	10	(16.67)
Tres	16	(26.67)	18	(30.00)	19	(31.66)
TOTAL	60	(100.00)	60	(100.00)	60	(100.00)

Fisher : Diferencias NS.

Tabla 55. Experimento 5. Grupo H (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón alfa 2b subcutáneas). Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros, obtenidos por animal en cada una de las tres laparotomías.

	Estadíaaje	Reestadíaaje	Final
	X ± DS	X ± DS	X ± DS
Grado adherencial	6.80±3.21	7.06±3.10	6.53±3.52
Milímetros	*** 16.70±5.84	*** 10.00±4.69	9.03±3.94
Grados	*** 8.86±2.69	** 5.80±2.67	* 5.06±2.01
Suma parámetros	*** 32.36±8.27	*** 22.86±7.69	* 20.50±7.13

* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0005

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

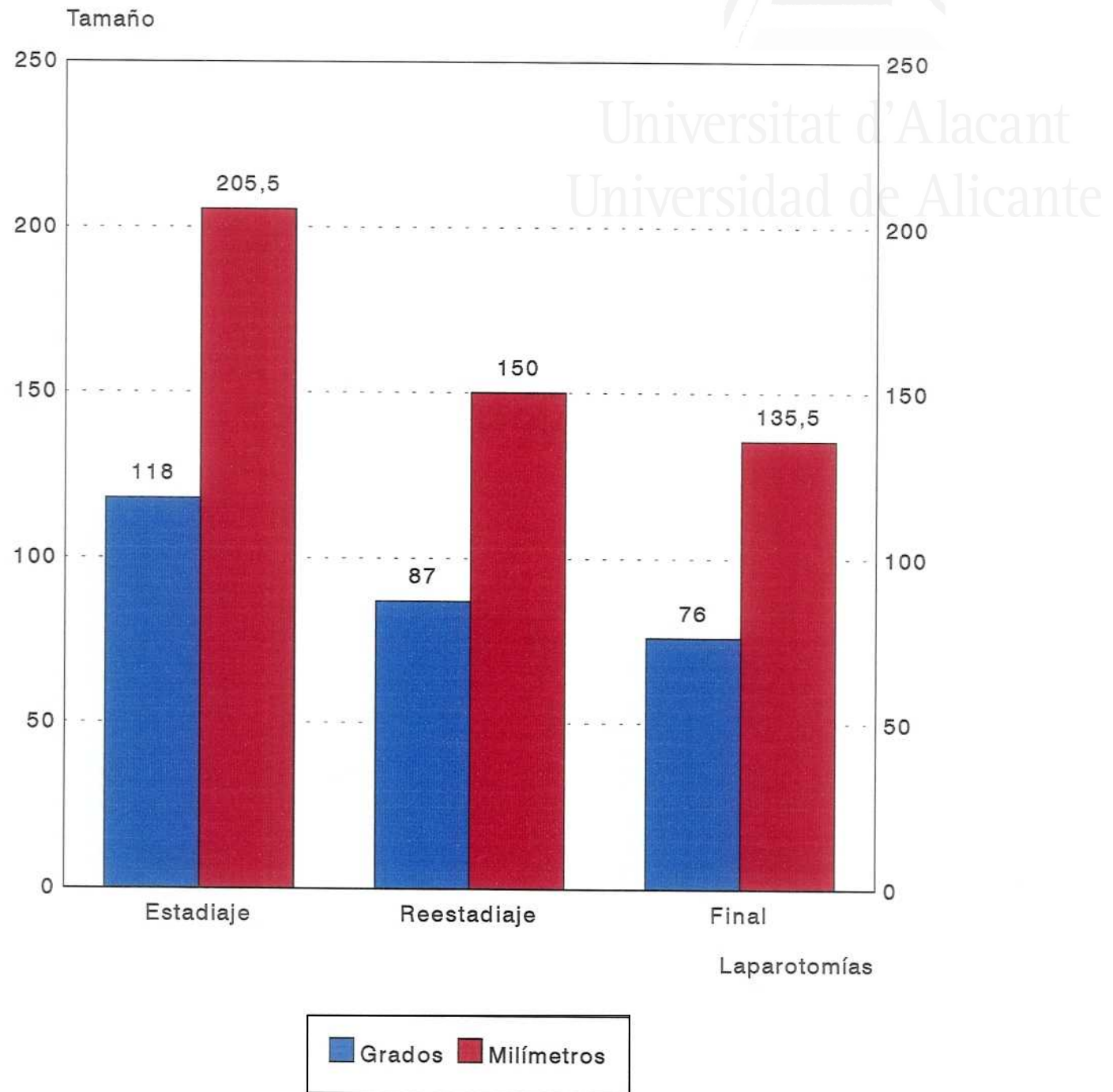


Figura 30. Experimento 5. Grupo H (animales tratados con 15 dosis de 50.000 U. de Interferón beta). Modificación de la suma del tamaño de todos los implantes desde la valoración realizada antes del tratamiento (estadiaje) hasta las valoraciones realizadas a los 30 días de finalizado el tratamiento (reestadiaje) y 90 días de finalizado el mismo (final).

Tabla 56. Experimento 5. Grado adherencial medio, tamaño medio en milímetros y grados y suma de los tres parámetros en el momento de la laparotomía final. Comparación entre los animales tratados con 50.000 U. de INF alfa2b SC (grupo F), los tratados con 50.000 U. de INF beta SC (grupo H) y el grupo control de animales no tratados (grupo A).

	GrupoF	GrupoA	GrupoH
	X ± DS	X ± DS	X ± DS
Grado adherencial	7.60±1.50	7.61±2.04	6.53±3.52
Milímetros	7.20±3.13 ***	17.62±7.51 ***	9.03±3.94
Grados	4.40±1.93 **	8.93±2.51 **	5.06±2.01
Suma parámetros	19.20±5.10 **	34.17±10.94 *	20.50±7.13

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Comparación de los porcentajes de reducción por implante y por animal

Aunque a medida que íbamos dando a conocer los resultados de los distintos experimentos recurrimos a experimentos previos para establecer comparaciones (el diseño de la investigación lo exigía), hemos optado por describir en último lugar los resultados comparativos de los porcentajes de reducción, tanto por implante como por animal, de los diversos grupos de estudio y de control. Como en ningún caso los resultados encontrados en la laparotomía de reestadiaje final fueron peores que los de la laparotomía de reestadiaje, los porcentajes de reducción que señalamos en las tablas siguientes se refieren al beneficio desde la valoración previa al tratamiento hasta la valoración final.

En la tabla 57 comparamos la reducción porcentual de tamaño por implante obtenida en el grupo control (grupo A), en los grupos tratados con 15 dosis de Interferón alfa 2b o beta (pautas largas) (Grupos E, F, G y H) y en los grupos tratados con las pautas cortas (una dosis intraperitoneal o 3 dosis subcutáneas de Interferón alfa 2b) (grupos C y D). Los grupos tratados presentaron diferencias significativas con el grupo control, pero las diferencias fueron mucho mayores para los tratados con pautas largas. Además, hubo diferencias significativas entre las pautas largas y las cortas. Considerada la reducción por animal en estos mismos grupos, las diferencias, aunque menores, todavía existieron en el mismo sentido previo (Tabla 58).

En la tabla 59 se compara la reducción porcentual de tamaño por implante aparecida en el grupo control (grupo A) y en los grupos tratados con 50.000 U de Interferón alfa 2b (grupo F) o de Interferón beta (grupo H). Los dos grupos que recibieron tratamiento presentaron porcentajes de reducción significativamente superiores que el grupo de control. Entre los dos grupos tratados no hubo diferencias. En ambos casos, cerca del 50% de los implantes redujeron su tamaño en proporción igual o superior al 50%, mientras que esto ocurría sólo en el 6% de los implantes del grupo de control. El 30% de las

vesículas desaparecieron macroscópicamente con ambos tratamientos. En el grupo control esto sólo ocurrió en el 3%. Pero cuando comparamos de la misma forma los porcentajes de reducción por animal, las cosas fueron distintas (Tabla 60). Sólo Interferón alfa 2b mantenía reducciones mayores del 50% en el 47% de los animales, frente a INFbeta que lo hacía en el 20% de ellos. Mientras que ningún animal tratado con Interferón alfa 2b experimentó una reducción inferior al 10%, esto ocurrió en el 26.67% de los que recibieron Interferón beta.

Comparando finalmente los porcentajes de reducción por implante entre los animales tratados (grupos C, D, E, F, G y H) y no tratados (grupo A) (grupo de control), se comprobó el beneficio global que aportaron los Interferones (Tabla 61). Aunque las diferencias con el grupo control son altamente significativas, éstas se ven disminuidas en esta tabla por la adición en el grupo de estudio de animales que recibieron dosis y pautas menos eficaces. Aun así, en la parte inferior de la tabla queda patente el alto beneficio logrado. El mismo tipo de comparación, pero efectuada por animal, arroja unas diferencias muy empobrecidas por el menor número de elementos (Tabla 62). No obstante, también el resumen del final de la tabla resulta clarificador.

Tabla 57. Porcentaje de reducción por implante entre las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento respectivamente). Comparación entre los animales tratados con pautas largas (grupos E, F, G y H), los que recibieron pautas cortas (IP ó SC) (grupos C y D) y el grupo control de animales no tratados (grupo A). Quedan excluidos aquellos implantes que tuvieron crecimiento 0 en la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento).

REDUCCION %	P. Larga			G. Control			P.Corta	
	N	(%)		N	(%)		N	(%)
90-100	** 69	(31.65)	*****	4	(3.39)	***	37	(16.44)
75-89	4	(1.83)		0	(0.00)		6	(2.67)
50-74	* 43	(19.73)	*****	3	(2.54)	***	29	(12.89)
25-49	47	(21.56)	*	14	(11.87)	*	46	(20.44)
10-24	26	(11.92)		20	(16.95)		37	(16.45)
< 10	*** 29	(13.31)	*****	77	(65.25)	*****	70	(31.11)
TOTAL	218 (100.00)			118 (100.00)			225 (100.00)	

Fisher: * $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.005$

**** $p < 0.0005$

***** $p < 0.0001$

P.Larga: Pautas largas.

G.Control: Grupo control.

P.Corta: Pautas cortas.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 58. Porcentaje de reducción por animal entre las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento respectivamente). Comparación entre los animales tratados con pautas largas de INFalfa2b ó beta (grupos E, F, G y H), los tratados con pautas cortas (grupos C y D) y el grupo control de animales no tratados (grupo A).

REDUCCION %	P.Larga			G. Control			P.Corta	
	N	(%)		N	(%)		N	(%)
90-100	3	(5.00)		0	(0.00)		2	(3.34)
75-89	6	(10.00)		0	(0.00)		3	(5.00)
50-74	* 16	(26.67)	***	0	(0.00)		6	(10.00)
25-49	25	(41.66)	****	1	(3.23)	**	17	(28.33)
10-24	* 4	(6.67)	*	7	(22.58)		12	(20.00)
< 10	** 6	(10.00)	*****	23	(74.19)	*	20	(33.33)
TOTAL	60	(100.00)		31	(100.00)		60	(100.00)

Fisher: * $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.005$

**** $p < 0.001$

***** $p < 0.0001$

P.Larga: Pautas largas.

G.Control: Grupo control.

P.Corta: Pautas cortas.

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la primera fila.

Tabla 59. Porcentaje de reducción por implante entre las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento respectivamente). Comparación entre los animales tratados con 50.000 U. de INF alfa2b SC (grupo F), los tratados con 50.000 U. de INF beta Sc (grupo H) y el grupo control de animales no tratados (grupo A). Quedan excluidos aquellos implantes que tuvieron crecimiento 0 en la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento).

REDUCCION %	GrupoF			GrupoA			GrupoH	
	N	(%)		N	(%)		N	(%)
90-100	16	(29.09)	*****	4	(3.39)	*****	14	(28.58)
75-89	0	(0.00)		0	(0.00)		2	(4.08)
50-74	12	(21.81)	****	3	(2.54)	**	10	(20.41)
25-49	14	(25.46)	*	14	(11.87)		9	(18.37)
10-24	5	(9.09)		20	(16.95)		6	(12.24)
< 10	8	(14.55)	*****	77	(65.25)	***	8	(16.32)
TOTAL	55	(100.00)		118	(100.00)		49	(100.00)

Fisher: * $p < 0.05$
 ** $p < 0.005$
 *** $p < 0.001$
 **** $p < 0.0005$
 ***** $p < 0.0001$

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 60. Porcentaje de reducción por animal entre las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento respectivamente). Comparación entre los animales tratados con 50.000 U. de INF alfa2b SC (grupo F), los tratados con 50.000 U. de INF beta SC (grupo H) y el grupo control de animales no tratados (grupo A).

REDUCCION %	GRUPO F			GRUPO A			GRUPO H	
	N	(%)		N	(%)		N	(%)
90-100	0	(0.00)		0	(0.00)		0	(0.00)
75-89	0	(0.00)		0	(0.00)		1	(6.67)
50-74	7	(46.67)	**	0	(0.00)		2	(13.33)
25-49	6	(40.00)	*	1	(3.23)	**	8	(53.33)
10-24	2	(13.33)		7	(22.58)		0	(0.00)
< 10	0	(0.00)	***	23	(74.19)		4	(26.67)
TOTAL	15	(100.00)		31	(100.00)		15	(100.00)

Fisher: * $p < 0.05$
 ** $p < 0.005$
 *** $p < 0.001$

Los asteriscos situados entre dos valores indican diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Situados a la izquierda de los valores de la primera columna indican diferencias estadísticas entre éstos y los valores de la última columna y la misma fila.

Tabla 61. Porcentaje de reducción por implante entre las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento respectivamente). Comparación entre los animales tratados (grupos C, D, E, F, G y H) y los no tratados (Grupo control) (grupo A). Quedan excluidos aquellos implantes que tuvieron crecimiento 0 en la laparotomía de estadiaje (antes del tratamiento).

REDUCCION %	G. Tratamiento		G. Control		Fisher
	N	(%)	N	(%)	
90-100	106	(23.93)	4	(3.39)	P<0.00001
75-89	10	(2.26)	0	(0.00)	NS
50-74	72	(16.25)	3	(2.54)	p<0.0001
25-49	93	(20.99)	14	(11.87)	p<0.05
10-24	63	(14.22)	20	(16.95)	NS
< 10	99	(22.35)	77	(65.25)	p<0.0000001
TOTAL	443	(100.00)	118	(100.00)	
* Mejoría	344	(77.65)	41	(34.75)	p<0.0001
** No modificación	99	(22.35)	77	(65.25)	p<0.0000001

* Mejoría: Porcentajes de reducción \geq 10%.

** No modificación: Porcentajes de reducción <10% o crecimiento.

G. Tratamiento: Grupos tratados.

G. Control: Grupo de control.

Tabla 62. Porcentaje de reducción por animal entre las laparotomías de estadiaje y final (antes y después del tratamiento respectivamente). Comparación entre los animales tratados (grupos C, D, E, F, G y H) y los no tratados (Grupo control) (grupo A).

REDUCCION %	G. Tratamiento		G. Control		Fisher
	N	(%)	N	(%)	
90-100	5	(4.17)	0	(0.00)	NS
75-89	9	(7.50)	0	(0.00)	NS
50-74	22	(18.34)	0	(0.00)	p<0.01
25-49	42	(35.00)	1	(3.22)	p<0.005
10-24	16	(13.33)	7	(22.58)	NS
< 10	26	(21.66)	23	(74.20)	p<0.0005
TOTAL	120	(100.00)	31	(100.00)	
* Mejoría	94	(78.34)	8	(25.80)	p<0.005
** No modificación	26	(21.66)	23	(74.20)	p<0.0005

* Mejoría: Porcentaje de reducción \geq 10%.

** No modificación: Porcentaje de reducción < 10% o crecimiento.

G. Tratamiento: Grupos tratados.
G. Control: Grupo de control.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DISCUSION

Sobre la endometriosis como materia de investigación

La endometriosis es una enfermedad apasionante para quien la estudia y terrible para quienes la padecen.

Se trata de un proceso ginecológico por excelencia, a cuyo diagnóstico se llega desde las más variadas circunstancias. En algunos casos las pacientes son atendidas en consultas de ginecología orgánica al manifestar fundamentalmente *álgias* o masa pélvica. En otras ocasiones, la endometriosis se diagnostica en el curso de un estudio de esterilidad, y son las unidades de reproducción las que asumen el tratamiento y seguimiento de estas pacientes. Cuando estas mujeres se quedan gestantes, su embarazo, por diversas circunstancias (esterilidad previa, abortos anteriores, maternidad añosa etc...), suele etiquetarse de alto riesgo, de forma que también los profesionales dedicados a la Obstetricia han de llevar a cabo el control de esta enfermedad. Todas las subespecialidades ginecológicas han de encargarse en algún momento de la atención a pacientes con endometriosis. Es una entidad patológica principal en el ejercicio de la ginecología.

Los procesos ginecológicos se presentan con mayor frecuencia de forma aguda. Los tratamientos en esta especialidad suelen ser, por fortuna, resolutivos. No acostumbra, por tanto, el ginecólogo a encontrarse con enfermedades insidiosas para las que no existe un tratamiento definitivo o, cuando menos, paliativo claramente establecido. Estos hechos, más ampliamente desarrollados al señalar en la introducción el estado actual de los conocimientos de la enfermedad, han movido a los ginecólogos a especular y realizar una actividad investigadora frenética en este tema. Desde el primer cuarto del presente siglo en que la enfermedad quedó clínicamente caracterizada, se han publicado miles de artículos sobre los más diversos aspectos de la enfermedad, pero lo fundamental permanece incierto. La etiopatogenia nos es desconocida y los tratamientos disponibles son caros y brindan poco beneficio a largo plazo.

Cuando una enfermedad dispone de un tratamiento curativo, importa poco lo que éste cueste. Sin embargo, cuando los tratamientos disponibles son de eficacia dudosa y, aún más, si no existe una clara superioridad de alguno de ellos sobre los demás, el precio debería condicionar la elección. Parrilla (277) señala que un tratamiento con Acetato de medroxiprogesterona a dosis de 30 mg/día cuesta 27.600 pesetas; un tratamiento con Danazol a dosis de 800 mg/día cuesta 79.200 pesetas; un tratamiento con Gestrinona a dosis de 2.5 mg dos veces a la semana cuesta 90.000 pesetas; un tratamiento con un Análogo de Gn-RH a dosis de 3.5 mg/mes cuesta 150.400 pesetas. Señala también este autor que Friedman calculó el coste de un tratamiento con un Análogo durante 24 meses más add-back (estrógenos conjugados equinos y Acetato de medroxiprogesterona) durante 21 meses, siendo de 956.480 pesetas, casi la mitad (1.736.060 pesetas) del coste de una histerectomía más doble anexectomía y los cuidados hospitalarios posteriores.

La necesidad de tratamientos más efectivos para la endometriosis es apremiante por las razones expuestas. Pero además en nuestro entorno la enfermedad es, desde tiempo atrás, tema constante de investigación. En el Departamento de Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alicante se había conseguido caracterizar perfectamente un modelo experimental en la rata Wistar con el que, después de varias tesis doctorales que estudiaron diversos aspectos de la enfermedad, se disponía de una enorme experiencia. El interés por los nuevos conocimientos sobre los aspectos inmunes de la endometriosis, la disponibilidad de medios técnicos y la experiencia en el manejo del modelo experimental, hicieron posible el inicio de esta investigación.

Quizás estos argumentos supongan una repetición de consideraciones ya establecidas en la introducción, pero he querido darles entidad propia porque, como es bien sabido, una hipótesis correctamente enunciada, con un diseño y una metodología adecuados y con resultados claros, pudiera carecer de interés si el problema que estudia no fuese pertinente. La pertinencia es una de las principales cualidades de una investigación (542).

Calnam resume en seis las razones principales para la divulgación médica honesta (543):

- Informar sobre algo anormal o inesperado para que los profesionales estén alertados.
- Informar sobre investigaciones experimentales que puedan afectar a la práctica clínica.
- Informar sobre una nueva enfermedad o tratamiento.
- Describir descubrimientos sobre equipos, instrumental, etc...
- Revisar la práctica ordinaria y resultados de tratamientos en un equipo o en un ambiente determinado para que otros investigadores puedan compararlos.
- Proponer una hipótesis basada en observaciones y pruebas.

Esta investigación engloba varias de las anteriores razones, lo que la constituye en materia adecuada para ser científicamente evaluada.

Discusión sobre algunos aspectos relacionados con la hipótesis, los objetivos y el diseño experimental

Los razonamientos conducentes a la elaboración de la hipótesis quedaron suficientemente argumentados en la introducción. No discutiré en este punto sobre los hallazgos inmunológicos demostrados tanto en la endometriosis humana como en la experimental, y el efecto que los Interferones pudieran tener sobre ellos, por ser materia a debatir posteriormente.

Los criterios empleados para elaborar la hipótesis han sido el de la plausibilidad biológica y el razonamiento por analogía (544). La plausibilidad biológica se refiere a la concordancia de la asociación (enfermedad y fármaco) con los conocimientos biológicos y clínicos actuales para producir un efecto médicamente conveniente (los Interferones modulan el sistema inmunológico en sentido opuesto a lo observado en la endometriosis). El razonamiento por analogía consiste en que, partiendo de asociaciones terapéuticas de naturaleza similar, se identifica una relación de eficacia para la asociación terapéutica actual (como mediante su acción antiproliferativa los Interferones reducen el tamaño tumoral, también podrían hacerlo con los implantes endometriósicos).

Sobre la validez del modelo de endometriosis experimental en rata para el estudio de la eficacia de terapias experimentales, la mayoría de los autores coinciden en considerarlo adecuado (316, 453, 462, 467, 468). La principal diferencia con la endometriosis humana, como ya se ha señalado, es que en este modelo los implantes de endometrio autotrasplantados presentan un crecimiento autolimitado. Es decir, que el tamaño alcanzado por los implantes a los 30-40 días de la inducción se mantiene inalterado (pequeñas oscilaciones) a lo largo del tiempo. Esto tiene la desventaja de que el factor de progresión que suele caracterizar la historia natural de la endometriosis humana no se puede valorar en este modelo. Sin embargo, este mismo aspecto supone una clara ventaja en el sentido de que permite la creación fácil de grupos homogéneos con extensión similar de la enfermedad previa al tratamiento.

Una de las afirmaciones más rotundas sobre los Interferones es la de que éstos son específicos de especie. La mayoría de las revisiones son coincidentes en este aspecto (507, 516, 517, 518). Sin embargo existen datos en la literatura que demuestran la inexactitud de la anterior afirmación. Ya en el año 1973, Cantell y Pyhala demostraron que el Interferón leucocítico humano era activo en conejos (522). Streuli (545) señala que mientras Interferón alfa 2 es dos veces más activo sobre células humanas que sobre bovinas, Interferón alfa 1 es 10-20 veces más activo sobre células bovinas que sobre las humanas. Para Borden, el Interferón beta manifiesta una importante especificidad de especie, pero Interferón alfa humano es capaz de actuar con eficacia sobre células heterólogas bovinas, porcinas y murinas (513). La inyección en ventrículos cerebrales de Interferón alfa humano, a dosis de 10.000 U, produjo un largo y duradero aumento en la actividad eléctrica del nervio esplénico simpático en ratas anestesiadas con Uretano; el mismo efecto que produjo una preparación de Interferón murino administrada en las mismas circunstancias (546). Se ha encontrado Interferón alfa recombinante humano ligado a membranas de tejido cerebral después de haber sido administrado a ratas (547). Mencies, en un estudio directamente dirigido a comprobar este hecho, pudo demostrar que una preparación de Interferón alfa murino tuvo la misma acción y similar potencia que el Interferón alfa humano (548). En resumen, los estudios biofísicos y bioquímicos indican que el Interferón alfa humano es sustancialmente activo en ratas (549).

¿A qué puede ser debida la diferente especificidad de especie de los distintos Interferones?.

Como ya se ha señalado anteriormente, la composición del Interferón alfa es exclusivamente proteica, mientras que los Interferones beta y gamma son proteínas glucosiladas. Este aspecto confiere a las sustancias diferentes propiedades farmacocinéticas que más adelante analizaremos, pero además algunos autores han atribuido a la fracción hidrocarbonada la responsabilidad en la especificidad de especie (515). La teoría propone que la actividad en especies cruzadas está anulada por los Interferones más glicosilados,

mientras que los que tienen pocos residuos de azúcar manifiestan más actividad en especies cruzadas (550, 551). En ese sentido, Ledesma afirma que Interferón alfa tiene poca especificidad de especie, algo mayor es la del Interferón beta y el Interferón gamma es absolutamente específico de especie (514). La idea, no obstante, no es compartida por todos; y así Bocci señala que los receptores celulares de membrana reconocen las moléculas de Interferón independientemente de su contenido en carbohidratos. La deglicoxilación del Interferón beta afectó en poca medida a la especificidad de especie de dicha sustancia (558). Permanece pues la duda sobre si es el carbohidrato o se trata de la fracción proteica el que confiere especificidad de especie a la unión receptor-ligando.

El Interferón murino utilizado en experimentación ha sido el no inmune (mezcla de alfa y beta) (553, 554) y el inmune (Interferón gamma recombinante murino) (555). Ambos requieren complicados procesos de laboratorio para su obtención. Aún asumiendo que probablemente el Interferón murino hubiese presentado un efecto más específico en nuestro modelo experimental, hay suficientes datos en la literatura para utilizar experimentalmente Interferón alfa humano en modelos murinos.

A pesar de su menor especificidad de especie, encontramos argumentos para ensayar el Interferón beta humano en la endometriosis experimental. Cuando se comparó la actividad antiproliferativa relativa de los Interferones naturales alfa y beta sobre 43 cultivos de 23 líneas celulares, Interferón beta produjo más del 20% de inhibición del crecimiento en 22 tipos celulares (88%) frente a una inhibición del crecimiento mayor del 20% en sólo 9 tipos celulares (36%) del Interferón alfa (556). Estos hallazgos indican que los distintos tipos de Interferón pueden diferir en sus efectos biológicos, reguladores celulares y clínicos. Experimentando con ratones, Asano encontró en ellos inducción de Interferón alfa cuando se les administró Interferón beta. Contrariamente la administración de Interferón alfa no indujo la formación de Interferón beta (557).

El diseño aplicado en nuestro estudio en orden a conseguir cada uno

de los objetivos propuestos fue el típico de casos y controles, pero con la particularidad de introducir un componente multiensayo secuencial que aportó ventajas y también inconvenientes.

La principal ventaja fue que al iniciar un experimento se contaba con la información suministrada por el/los experimento/s previo/s. De no haber sido así, el diseño respecto a dosis, pautas y vías de administración hubiera tenido que ser completamente especulativo y con riesgo grande de error.

La desventaja fundamental correspondió a la imposibilidad de hacer una distribución aleatoria de los animales de cada grupo de tratamiento. El hecho de que se tratase de experimentos independientes separados en el tiempo anuló dicha posibilidad. La consecuencia de ello pudiera haber sido el que los animales de experimentos diferentes hubieran estado expuestos a circunstancias distintas, no controlables, que provocasen reducción de la homogeneidad. Si esto hubiera sido así, las conclusiones obtenidas en base a diferencias encontradas al comparar grupos no homogéneos no serían válidas. Por fortuna, en todos los aspectos que consideramos que pudieran ejercer influencia, nuestros grupos se comportaron de manera homogénea. Por otro lado, investigaciones previas en nuestro Departamento han mostrado la reproducibilidad del modelo experimental en diferentes ocasiones (503, 504, 428). La aleatorización sólo fue posible en los experimentos en que se incluía más de un grupo de animales (experimentos 1, 2 y 4).

Podría cuestionarse la validez de un grupo de ratas con endometriosis experimental no tratadas como grupo control. Es posible que la administración de placebo hubiera dado lugar a un mejor grupo de referencia. Pero ello hubiera significado la necesidad de crear varios controles con pautas y vías de administración del placebo distintas. En los ensayos terapéuticos es necesario la creación de grupos de control por tres razones (544). En primer lugar, porque la mayoría de las enfermedades tienen un curso imprevisible y la intervención del fármaco ha de valorarse en el contexto de la evolución natural de la enfermedad. En segundo lugar, por el fenómeno conocido de la regresión

a la media, según el cual las enfermedades no letales tienden a mejorar con el paso del tiempo. En tercer lugar, por el llamado "efecto Hawthorne" o tendencia de las personas a modificar su comportamiento por ser objeto de interés y eventualmente responder a la atención que se les da. Nuestro grupo de control es adecuado para descartar la interferencia sobre los resultados del tratamiento de las dos primeras razones señaladas. La interferencia del "efecto Hawthorne" sobre los resultados de un tratamiento se evitaría únicamente con administración de placebo en el grupo de referencia, sin embargo este efecto, evidente en los ensayos clínicos con humanos, es mucho más cuestionable en la experimentación animal.

En el experimento 2 se introdujo, para determinar el efecto de la terapia sobre los implantes a lo largo del tiempo, un pequeño estudio de cohortes. Este diseño tuvo la ventaja de seguir la secuencia real de los hechos, pero al realizarse las valoraciones temporales sobre animales distintos se introdujo el sesgo de la variabilidad biológica individual. Es decir, que hemos supuesto que todos los elementos mostrarían la misma intensidad de respuesta al añadir una misma dosis del fármaco estudiado, y eso pudo no ser cierto. Para evitar el sesgo, hubiéramos tenido que realizar las valoraciones temporales sobre el mismo grupo de animales. Ello significaría haber realizado dos laparotomías más por animal en corto periodo de tiempo, multiplicando el riesgo de evisceraciones y otras complicaciones. Decidimos realizar el diseño secuencial y asumir el sesgo indicado.

La valoración del efecto a largo plazo del tratamiento se realizó entre 90 y 120 días tras la conclusión de la terapia. La rata es un animal poliestral. Cada ciclo estral dura 4 ó 5 días y consta de varias fases: Proestro, estro, metaestro (llamado por algunos diestro I), diestro (denominado a veces como diestro II). Esto supone que, desde la terminación de la terapia hasta la valoración de su efecto a largo plazo, cada animal tuvo entre 18 y 30 ciclos estrales. Parece un tiempo suficiente para demostrar efecto sostenido. Jones, en un modelo idéntico al nuestro, estimó en 8 semanas el tiempo adecuado para valorar a largo plazo el efecto de Levonorgestrel, Danazol, Análogos de Gn-RH

y castración (438).

Hemos asumido en el experimento 5 que dosis, vías de administración y pautas terapéuticas son similares para Interferón alfa 2b e Interferón beta. Así hemos valorado el efecto del INFbeta comparativamente con INFalfa2b, aplicados ambos de la misma forma. Eso, indudablemente, puede no ser cierto. Ambas sustancias actúan sobre un receptor celular común (520), se emplean en la clínica humana a las mismas dosis y por las mismas vías (537), y presentan efectos biológicos y farmacodinamia similares (558, 559). Sin embargo, su composición y su farmacocinética son distintos. INFbeta es una glicoproteína, mientras que INFalfa es una proteína sin carbohidratos. Debido al carbohidrato, INFbeta es una molécula hidrofóbica, tisulílica, que permanece anclada en los tejidos donde se sintetiza. Contrariamente, INFalfa difunde al plasma porque es menos hidrofóbica y más plasmafilica al no contener azúcares. Según Bocci, esas diferencias no traducen distinta potencia en sus funciones biológicas aunque sí distintos perfiles metabólicos (552).

Discusión de aspectos relacionados con los métodos

La forma de manipular a los animales es un aspecto no reseñado en los trabajos, más bien transmitido y aprendido de forma práctica. El modo en que manejé a las ratas, detalladamente explicado en los métodos, fue fruto de experiencias transmitidas y de observaciones propias, algunas de las cuales señalo a continuación para justificar mi método.

La rata dispone de unos miembros superiores cortos y débiles que le sirven fundamentalmente para realizar tareas precisas con poco requerimiento de fuerza. Por el contrario, sus miembros inferiores son largos y fuertes. Con ellos realiza la deambulación y, sobre todo, el salto. Cuando el animal se desplaza libremente en espacios amplios combina la carrera, si no se ve acosado, con el salto, que permite mayor velocidad y se emplea en la huida. Si se evita el apoyo de las extremidades inferiores el animal está indefenso, ya que su único apoyo son los miembros superiores que "a duras penas" soportan su peso. Además posee unos músculos paravertebrales potentes, de forma que si se la mantiene suspendida de la cola sin proporcionarle un lugar para desencadenar el reflejo de apoyo, tiende en unos instantes a girar sobre sí misma y morder el objeto que la suspende. Carece este roedor de una buena visión, pero suple tal carencia con un extraordinario olfato y un agudo oído.

La percepción por las ratas del temor y nerviosismo de la persona que los va a manipular es un hecho bien documentado en veterinaria y que he podido comprobar. Se mostraban en dicha circunstancia agitadas y sus reacciones eran más rápidas y desconfiadas.

En mi opinión, la manipulación de estos animales debe realizarse de forma coordinada y precisa. Los movimientos han de ser rápidos y los desplazamientos cortos. Siempre que sea posible se ha de mantener una mano libre para ayudar a inmovilizarlo en caso de escurrimiento. Resulta conveniente también mantenerlo tapado. Cuando el animal no ve, se siente oculto y se

tranquiliza.

Para la anestesia, hemos empleado una combinación, en proporción 1/50, de Droperidol y Fentanilo (Thalamonal[®]). El Droperidol es un neuroléptico mayor del grupo de las butirofenonas. Fentanilo es un potente analgésico narcótico. Su uso conjunto es lo que se conoce como neuroleptoanalgésia. Los principales efectos secundarios de esta combinación son la depresión respiratoria, hipotensión, hipertonía muscular y efectos anticolinérgicos. Es muy probable que los ocho fallecimientos accidentales estuvieran relacionados con el procedimiento anestésico. La utilización aislada de Fentanilo quizás hubiese sido más adecuada, al evitar la sumación de efectos depresores de la función respiratoria. No obstante, consideramos ventajoso este método anestésico por varias razones: Resulta cómodo de administrar (inyección intramuscular), mantiene la letargia durante el tiempo justo para el acto quirúrgico y proporciona una buena analgesia en las horas siguientes, con lo que se evita la aplicación de otras sustancias que pudieran influir en los resultados y se garantiza que el animal no sufre. En la literatura, se describe en pocos casos el procedimiento anestésico empleado. Los más frecuentes han sido Eter (437, 453, 454, 456, 494), Ketamina y Halotano (450, 462), Uretano (546) y Pentobarbital sódico intraperitoneal (455).

Respecto al método de inducción de la endometriosis, algunos investigadores han propuesto la implantación de endometrio en el tejido subcutáneo de los animales de experimentación, con el objetivo de poder valorar su crecimiento sin necesidad de recurrir a laparotomías. De este modo, Berquist y cols. (501), estimaron el tamaño de los implantes por simple palpación. Stöckemann (470), comprobó la formación de vesículas por resonancia nuclear magnética. Aoki (376), evaluó ecográficamente el crecimiento de fragmentos de endometrio humano trasplantados en el tejido subcutáneo de ratonas carentes congénitamente de inmunidad humoral y celular (SCID mice). Es evidente que la valoración adecuada requiere la visión directa. El aspecto, la medida objetiva y exacta de las vesículas, y las adherencias, sólo se pueden determinar correctamente mediante laparotomía. Desde otro punto de vista, la endometriosis extraperitoneal remeda en menor grado a la endometriosis humana al no influir

ni ser influida por el medio peritoneal.

¿Por qué utilizamos el método de Jones para inducir quirúrgicamente la endometriosis?

Existen fundamentalmente dos métodos de autotrasplante endometrial en ratas. El primero de ellos fue descrito por Jones en 1984. Consiste en la colocación de explantes endometriales, obtenidos al separar microquirúrgicamente el endometrio del resto de los componentes histológicos del útero (438). El segundo método lo describió Vernon un año más tarde, y difiere del anterior en que se implantan fragmentos uterinos completos (437). A pesar de su mayor complejidad y requerimientos tecnológicos, con el paso del tiempo, se ha impuesto el procedimiento de Jones (450, 453-456, 462, 467). En nuestro Departamento, Brotons estudió la eficacia de ambos métodos, demostrando mejor rendimiento de la técnica de Jones en términos de mayor porcentaje de buen crecimiento de los implantes (503).

La rata dispone de una extraordinaria resistencia a las infecciones. Algunos trabajos de este tipo se han realizado bajo condiciones estériles (437, 450, 462, 494). Nosotros utilizamos una técnica limpia pero no estéril. Excepcionalmente encontramos pequeñas colecciones purulentas en la pared abdominal, nunca intraperitonealmente. No parece necesaria la adopción de esta medida en este tipo de experimentación, aunque de disponer de la infraestructura necesaria sería recomendable su empleo.

Después de resecado el hemiútero del que obtendríamos el explante endometrial, todo el trabajo microquirúrgico, emulando a otros trabajos (450), se realizó sobre placa de Petri con suero fisiológico a temperatura ambiente. Este medio evitó la desecación de los tejidos y no influyó en el posterior crecimiento de los implantes. Vernon, aunque no efectuó despegamiento del endometrio, realizó la apertura y fraccionamiento de la pieza resecada en un medio compuesto por Ham F-10, a 37 grados centígrados (437). El tamaño de las vesículas que él encontro no fue diferente del de las nuestras, por lo que parece que el medio en

que se suspenden los tejidos no influye en su crecimiento posterior. Tampoco la temperatura afecta a dicho aspecto, como lo demuestra el hecho de que, en nuestro estudio, el tamaño de los implantes colocados en primer lugar fuese similar al de los colocados en último lugar.

El peritoneo resulta un lugar idóneo para la colocación de los autotrasplantes por varias razones. Permite un acceso quirúrgico rápido y poco complicado, evitando tiempos operatorios largos que favorecerían la formación de adherencias. Por su mayor grado de vascularización, se consiguen mayores porcentajes de viabilidad de los autotrasplantes (428). La visión de los implantes es fácil, haciendo posible la localización del 100% de los mismos. En este sentido, 9 de los 182 implantes que Quereda efectuó en meso intestinal no pudieron localizarse en las laparotomías posteriores, mientras que todos los colocados en peritoneo (364 implantes) fueron correctamente identificados en las evaluaciones subsiguientes (428).

Elegimos cuatro explantes porque ello nos proporcionaba una buena cantidad de endometrio ectópico con un menor número de animales. Haber puesto más implantes hubiera podido dificultar, en gran medida, la valoración de las modificaciones de cada uno de ellos. La experiencia demuestra que aunque parezca que se colocan muy separados, la formación de adherencias y el propio crecimiento de las vesículas favorecen la coalescencia. No hemos encontrado precedentes en la literatura con más de cuatro implantes por rata. Este número ha sido muy variable, mencionándose un implante (453), dos implantes (450, 462), tres (428, 541) y cuatro (437).

Aunque muchos autores citan un aumento de las adherencias por la existencia de endometriosis experimental (478, 481, 560, 561), nosotros pensamos que las suturas con las que se fijan los implantes pueden jugar cierto papel contributivo en la génesis de las mismas. Todo ello se vería favorecido por la posición prona en la que viven estos animales, depositándose directamente las asas intestinales y el epiplon sobre los implantes y las suturas. Por ésta y por las demás razones que indicaré a continuación, utilicé, para fijar cada implante, un

sólo punto de Polipropileno de 5/0 anudado con cuatro nudos. El Nylon ha sido el material de sutura empleado universalmente para este propósito. Vernon utilizó un sólo punto de Nylon de 4/0 (437), mientras que Rajkumar necesitó para fijar cada implante cuatro puntos de Nylon monofilamento de 6/0 (450).

Polipropileno es un polímero formado por moléculas de cadena larga en las que se repite la unidad propileno. Es un hilo de elevada resistencia a la tracción, equiparable en este sentido al Nylon. Desde el punto de vista químico es muy inerte y resistente a los ácidos y los álcalis. Causa una reacción tisular mínima, a diferencia del Nylon que produce reacciones inflamatorias que pueden durar varios meses. Después de largos periodos de tiempo, no sólo permanece, sino que mantiene en el organismo su resistencia inicial. Esas condiciones lo han convertido en el material de elección en cirugía plástica, vascular y en las suturas de nervios (562). A todas estas ventajas une, para nuestro propósito, las de ser monofilamento, irreabsorbible y comercializarse coloreado (azul), lo que permite su segura identificación aún en el caso de haber desaparecido completamente el explante. El único inconveniente es el de su escasa flexibilidad, lo que hace necesario la realización de varios nudos para evitar que el anudado se deshaga. Cuatro fueron los que consideramos como mínimo indispensable.

No hemos tenido en cuenta el momento del ciclo estral en que se practicó la inducción ni en el que se realizaron los estadiajes posteriores. Pensamos, como otros autores (453), que este factor no influye en la tasa de éxito de la inducción ni en el crecimiento del implante.

La segunda laparotomía realizada a cada animal, denominada por nosotros de estadiaje, tuvo como objetivo valorar el tamaño de las vesículas a las que el endometrio autotrasplantado dió lugar. Se realizó entre 30 y 45 días tras la inducción. En su publicación pionera, Vernon y Wilson, indicaron cómo los implantes crecieron desde 1.5 mm al colocarlos, hasta un máximo de 5 mm en el día 60 postinducción (437). Más tarde, Brotons comprobó que los implantes valorados entre 30 y 40 días después de la inducción presentaban un tamaño estable, observando que únicamente el 5% de ellos continuaban creciendo una

vez valorados (541). Al igual que otros investigadores (560), Quereda apreció que por más tiempo que dejara transcurrir desde la colocación de los autotrasplantes hasta la valoración de su tamaño, los mismos no parecían mostrar un mayor crecimiento. Es decir, que los implantes una vez que han alcanzado un crecimiento determinado no tienden a crecer más (428). Este momento ha sido establecido por algunos en dos semanas (454, 456, 467), para otros en tres semanas (453), cuatro semanas (438, 450) o incluso seis semanas (437, 494).

En cuanto a los sistemas seguidos para estadiar la endometriosis experimental, tanto por implante como por animal, quedaron argumentadas las razones para utilizar dichos métodos en el lugar en que se describieron. Baste ahora realizar un breve comentario aclaratorio sobre la forma en que se midieron las vesículas. La perfecta correlación del diámetro longitudinal (diámetro mayor) del implante con la anchura, superficie y volumen del mismo fue demostrada por Vernon y Wilson (437). Aceptando lo previo, decidimos utilizar el diámetro máximo como medida única de valoración del implante. Sistema de evaluación, por tanto, objetivo.

Respecto a la catalogación de las adherencias seguimos la clasificación propuesta por Quereda (428). Con ella tratamos de reflejar su severidad en una escala semicuantitativa que, aunque con límites arbitrarios, fuese fiel reflejo del aspecto subjetivo de mayor o menor gravedad.

Con relación a la dosis de Interferón, consideramos 400.000 U/Kg como la dosis estándar, lo que supuso unas 100.000 U por animal. Estas dosis han sido las empleadas con este tipo de animales en otros trabajos (563, 564). Corresponden a 1/40 de las dosis mayoritariamente empleadas en la clínica humana (3-5 millones), y coinciden con las adaptaciones que se han realizado para otros fármacos al extrapolar dosis del hombre a la rata (428, 438, 441, 457).

Hicimos equivalente una dosis de 100.000 U administrada intraperitonealmente a tres dosis de 100.000 U administradas subcutáneamente

a días alternos, basándonos en los datos bibliográficos referidos a la farmacocinética de los Interferones. Bocci (534), en una revisión extensa, señaló que algunos autores como Berek habían reportado niveles de Interferón en fluido peritoneal, por lo menos durante 24 horas siguiendo a su administración por la misma vía, 30-100 veces superiores que los niveles plasmáticos. Los niveles de Interferón en cavidad peritoneal permanecieron detectables durante, por lo menos, 5 días. Parece evidente que la cavidad peritoneal actúa como reservorio, siendo mayoritariamente absorbida la sustancia a través de los linfáticos subdiafragmáticos. Resultaría fácil retrasar la absorción con simples maniobras posturales que disminuyeran el contacto del fluido peritoneal con el diafragma.

La administración de Interferón por vía subcutánea comenzó siempre a las 48 horas de la laparotomía de estadiaje. El riesgo de producir eventraciones/evisceraciones, al ejercer compresión sobre el animal para inmovilizarlo, fue lo que nos movió a demorar durante ese tiempo la primera administración del fármaco. A partir de ahí, las dosis sucesivas se aplicaron cada 48 horas hasta completar 3 ó 15 dosis, según se tratase de pauta corta o larga respectivamente. Los argumentos en favor de esta metodología derivan de la farmacocinética de los Interferones humanos aplicados a animales de experimentación. En 1975, Harmon y Janis (522), investigando en ratones, apreciaron que una simple inyección intramuscular de Interferón humano mantenía niveles detectables de la sustancia durante 48 horas, y que inyecciones subcutáneas parecían mostrar mayores persistencias. Cantell y Pyhälä (565), también compararon los niveles séricos de Interferón en hamsters, conejos, ovejas y hombres, después de la administración intravenosa de diferentes dosis de Interferón leucocítico humano. Obtuvieron los mismos resultados en cada especie. El nivel sérico de Interferón dependía directamente de las U/peso corporal inyectadas. Con 300.000 U de INFalfa humano/Kg. de peso se mantenían niveles séricos de 100 U/ml., durante al menos 12 horas. Cuando la administración era por vía intramuscular o subcutánea, los niveles séricos persistían durante un tiempo superior.

Establecimos en 15, las dosis de Interferón a administrar en la denominada pauta larga. Este número fue elegido arbitrariamente, pero con los siguientes condicionantes. Nuestra intención era administrar el mayor número posible de dosis. Sin embargo, teníamos una limitación impuesta. El Interferón humano es un producto biológico antigénicamente extraño para la rata, sensibilizante e incapaz teóricamente de presentar actividad una vez anulado por reacciones neutralizantes de antígeno-anticuerpo. Aunque conceptualmente cuando el fármaco es neutralizado por anticuerpos específicos pierde toda su eficacia, la experiencia práctica parece no confirmar exáctamente ese aserto. Se han comunicado raros casos en que pacientes sometidos a tratamiento con Interferón alfa2b recombinante desarrollaron anticuerpos neutralizantes. Varios de estos pacientes todavía continuaron presentando respuestas clínicas al tratamiento (566). En la rata, después de tres infusiones intravenosas, ya aparecieron en algunos animales anticuerpos antiinterferón (564). Pensamos, por la razón expuesta, que más de 15 dosis no aportarían beneficio adicional.

Aprovechar la cardiopunción, necesaria si queríamos obtener sangre que sería utilizada en posteriores estudios, para el procedimiento de sacrificio fue una buena idea. El método se antojó rápido, indoloro y seguro. El óbito por embolia gaseosa fue instantáneo, registrándose excepcionalmente alguna convulsión previa. Los métodos clásicamente utilizados, como la fractura cervical o la dosis anestésica letal, no tuvieron lugar en este estudio.

La recogida de todos los datos del protocolo, incluido el estadiaje de implantes y adherencias, se realizó directamente en el curso de cada laparotomía, evitando siempre el hacerlo de forma diferida a partir de descripciones anotadas. Algunos aspectos se obtuvieron de una forma totalmente subjetiva, como la vascularización o la fibrosis de la pared del animal en las laparotomías iterativas. Debido a esa subjetividad y a la irrelevancia de dichos datos sobre los objetivos de la investigación, no fueron finalmente analizados y, por tanto, desechados.

Discusión de los resultados

Una medida del aprovechamiento de los recursos la constituye el porcentaje de animales incluidos en el estudio sobre el total de los suministrados (88.15%). Descartando a las 12 ratas que voluntariamente se destinaron al entrenamiento en los aspectos microquirúrgicos y valoración de implantes y adherencias, quedarían sólo 11 animales (5.67%), destinados a formar parte del material de investigación, que por distintas razones (fallecimiento accidental o fallo de inducción) fueron excluidos del estudio. Este dato generalmente no es señalado en las publicaciones de las revistas científicas. Hay que recurrir a memorias de investigación para obtener datos de otros autores. Así, en las memorias previas de nuestro Departamento, el porcentaje de exclusión se situó en el 12% (428, 567). Las causas que motivaron tales diferencias se analizan a continuación.

Todos los fallecimientos accidentales de nuestro estudio (8 casos, 4.12%) se produjeron en el postoperatorio inmediato, y estuvieron directamente relacionados con el procedimiento anestésico. Porcentaje inferior al obtenido por Barragan (10.71%) (567) y similar al obtenido por Quereda (5.96%) (428), utilizando idéntico método. Ya hemos señalado cómo probablemente la asociación anestésica empleada, por el alto grado de depresión respiratoria que produce, estuviese en el origen de esos óbitos. Nuestro menor porcentaje de fallecimientos con respecto a los de los autores señalados fue debido a un mejor conocimiento de las dosis utilizadas y de la aplicación de estímulos a los animales. Téngase en cuenta que dichos investigadores forman parte de nuestro grupo, con lo que he aprovechado su experiencia en beneficio propio. Además, a lo largo de la investigación, he tratado de aumentar la atención al postoperatorio inmediato de estos animales, mediante movilización periódica y emisión de ruidos frecuentes, hasta comprobar un grado de vigilia adecuado. En el estado somnoliente que caracterizó a los primeros momentos del despertar, era frecuente observar que los animales se agrupaban, unos encima de otros, impidiendo los movimientos respiratorios torácicos de los situados debajo.

Apercibidos de ello, fuimos corrigiendo tal circunstancia a medida que avanzaba el estudio. La eficacia de las medidas adoptadas se comprueba al observar que 7 de las 8 ratas fallecidas pertenecieron a los 90 primeros animales (50%), mientras que entre los últimos 90 (50%) sólo falleció una rata.

Otro aspecto que acentúa la rentabilidad del modelo ha sido el elevado índice de éxito en la inducción de la endometriosis (98.27%). Este resultado está más en la línea de los que señalan que todos los implantes crecieron (437, 450, 455, 462, 472) y se aleja de los que comunican peores resultados (453, 467, 478). En nuestro Departamento Brotons consiguió un 93.70% de éxito (541), Barragán un 96.9% (567) y Quereda un 88.8% (428). Basamos nuestra mejor tasa de éxito en tres argumentos. En primer lugar, la colocación de todos los implantes en la superficie peritoneal parietal pudo suponer una ventaja con respecto a los anteriores trabajos, en que parte de los implantes se realizaban en el meso intestinal. Quereda ya demostró la superioridad la primera zona en términos de crecimiento de las vesículas (428). En segundo lugar, la propia técnica de colocación de los fragmentos de endometrio que hemos empleado parece que pudiera ser más eficaz. Para fijar cada implante en la superficie peritoneal se recurrió en los trabajos previos a pellizcar con una pinza de Crile un fragmento de dicho tejido, sobre el que se traccionaba para hacerlo accesible. Con la nueva tabla de trabajo, diseñada especialmente para este estudio, conseguíamos una separación automática de las paredes abdominales del animal, de forma que la exposición de la superficie peritoneal era perfecta sin necesidad de maniobras auxiliares. La contusión tisular provocada por la pinza de agarre en las proximidades del lugar de fijación del implante, pudo disminuir la vascularización de la zona con el consiguiente deterioro de su crecimiento. En tercer lugar, al emplear en nuestro estudio cuatro implantes por animal, en vez de los tres realizados en los trabajos previos, la posibilidad de que ninguno de los implantes creciera fue menor.

En conexión directa con los últimos argumentos se sitúan los datos de buen o mal crecimiento de la endometriosis en los animales en los que la inducción resultó exitosa. También los resultados obtenidos en este trabajo son

claramente superiores a los obtenidos previamente en nuestro Departamento. Fueron catalogados como con buen crecimiento (grados II ó III) el 84.44% de los implantes en el presente trabajo, frente al 71.20% en el de Brotons (541), el 72.30% en el de Barragán (567) y el 70.80% en el de Quereda (428).

Los resultados del primer experimento demuestran que la endometriosis experimentalmente inducida en la rata wistar no se modifica espontáneamente con el paso del tiempo. A esta misma conclusión habían llegado Vernon y Wilson cuando comprobaron que a los 10 meses de la laparotomía de estadiaje los animales mantenían la misma cantidad de endometriosis previa (437). También Rajkumar utilizó en su trabajo un grupo control de animales con endometriosis inducida, no tratados, en los que pudo comprobar estabilidad en el tamaño de los implantes tres meses después del estadiaje inicial (450).

La coincidencia de los estudios previos reafirma la idea de la estabilidad de la endometriosis experimental. Sin embargo, no sabíamos en que modo podía influir la práctica de varias laparotomías sucesivas sobre el endometrio ectópico. Las laparotomías suponían estrés para los animales, con aumento de esteroides suprarrenales, cuya repercusión, aunque probable, era incierta. Del mismo modo, en las intervenciones se manipulaban las vesículas y se sometía a éstas a la influencia del aire ambiente. Era desconocido para nosotros el efecto que estas circunstancias podían tener sobre la endometriosis previa, y no tenerlo en cuenta hubiera podido restar validez a los resultados de los distintos tratamientos.

Ni la distribución de los implantes en grados de crecimiento, ni el tamaño medio de la suma de los cuatro implantes de cada animal, en milímetros o en grados, cambiaron a los 60 ó 120 días con respecto al estadiaje inicial. Esto demuestra que la práctica de la laparotomía de reestadiaje, con las circunstancias señaladas que la acompañaron, no ejerció influencia sobre el tamaño previo de la endometriosis experimental. Tal extremo se ve reforzado al comprobar que la modificación de la suma total de todos los implantes resultó en un ligerísimo incremento, inferior al 3%.

Es cierto que algunas vesículas oscilaron discretamente de tamaño, pero lo hicieron, tanto incrementándose unas, como disminuyendo otras, lo que evidencia una ausencia de influjo definido de las circunstancias evaluadas.

La mayoría de los autores coinciden en señalar un aumento en la aparición de adherencias por la existencia de endometriosis experimental (428, 473, 485, 541, 560, 561). Otros, sin embargo, niegan dicha relación (450, 479). Las adherencias fueron la norma en nuestros animales. Las encontradas al estadiar a los animales del primer experimento no mostraron diferencias de grado con el resto de los animales del estudio. Parecieron mostrar un discreto incremento al sucederse las laparotomías, aunque sólo al considerar el grado adherencial medio por animal hubo diferencias estadísticamente significativas entre las valoraciones inicial y final. Es lógico que ocurriese así. Independientemente del papel que las suturas de Polipropileno y la propia endometriosis puedan tener en la génesis de las adherencias, las laparotomías, mediante la desecación de los tejidos y los restos hemáticos sometidos a procesos de fibrinoformación y fibrinolisis, generan "per se" incremento adherencial.

En conjunto, la integración de los múltiples hallazgos puntuales de los distintos componentes del sistema inmunológico encontrados en la endometriosis, se ha realizado desde tres puntos de vista distintos.

Algunos autores, basándose en las alteraciones del componente humoral del sistema inmunológico, opinan que se trata de una enfermedad autoinmune (568-571). La presencia de títulos séricos de autoanticuerpos organoespecíficos (anticuerpos antiendometriales) (572) o, en menor medida, contra componentes celulares (anticuerpos anticardioplipina) (573) parecen apoyarlo. Otros hallazgos son menos consistentes con esta visión del problema. Así, la ausencia de asociación con ciertos antígenos del sistema HLA, característica común de las enfermedades autoinmunes, haría menos probable la etiología autoinmune (574, 575).

En segundo lugar, estarían los que defienden que un déficit celular

inmunológico es la condición etiopatogénica básica que condiciona esta enfermedad. Según esta hipótesis, cuando los sistemas celulares de aclaramiento de los fragmentos endometriales desplazados son sobrepasados, la enfermedad se desarrolla. Los esfuerzos del sistema inmunológico celular por limitar el crecimiento endometrial ectópico, aunque insuficientes para ese propósito, jugarían un papel crítico en la activación de las células B, que pasarían de estar en reposo a alcanzar un estado activado con ulterior diferenciación y producción de anticuerpos (576-579).

Finalmente, a los elementos más primitivos e inespecíficos del sistema inmunológico también se los ha implicado en la génesis de la enfermedad. Se trata de la teoría de la activación macrofágica como causa de endometriosis (580). Los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis son más grandes, más maduros y están hiperactivados. Producen más factores de crecimiento y Fibronectina. Los fibroblastos peritoneales necesitan dos factores para proliferar: Factor de competencia y factor de progresión. Las sustancias estimuladoras del crecimiento y la Fibronectina serían el factor de competencia para fibroblastos y células del estroma endometrial. El factor de progresión lo constituirían los estrógenos. Así, en presencia de flujo menstrual retrógrado, aumento de la activación macrofágica e hiperestronismo relativo, las condiciones serían óptimas para el desarrollo del cuadro (581).

Llegados a este punto, y en vista de la coexistencia en la enfermedad de múltiples alteraciones del sistema inmune, integradas de formas conceptualmente distintas, las posibilidades de inmunomodulación son fundamentalmente dos. La terapia inmunosupresora o la inmunoexaltadora.

La terapia inmunosupresora ha sido propuesta por los profesionales más dedicados a la medicina de la reproducción, preocupados por las consecuencias que los factores liberados en las reacciones inmunes pudieran tener sobre la fertilidad de estas pacientes (582, 583). Experimentalmente se han ensayado corticoides (584, 585), Pentoxifilina (586, 587), Verapamil (488), Lipiodol (588) e indometacina (486). In vitro, se ha estudiado el efecto

inmunosupresor de Danazol (589, 590, 591) y de la Gestrinona (592). También en la clínica ha sido investigada la modulación inmunológica de Danazol (593, 594), Danazol y análogos de la Gn-RH (595, 596) y de los agonistas de Gn-RH aisladamente (597). En general, los resultados comunicados con estas modalidades terapéuticas han sido buenos o muy buenos en orden a recuperar la fertilidad perdida. Sin embargo, cuando D'Hooghe estudió el efecto de la inmunosupresión con Metilprednisolona y Azatioprina en babones con endometriosis espontánea, comprobó que los animales inmunosuprimidos tuvieron un número y tamaño significativamente mayor de lesiones endometriósicas que los animales del grupo control no tratados (598).

La terapia inmunoexaltadora está mucho menos desarrollada. Su propuesta parte de la preocupación, no tanto por los fenómenos reproductivos sino por las manifestaciones clínicas y los aspectos de progresión y recidiva endometriósicas. Las posibilidades en este sentido son más limitadas y entrañan gran complejidad. El sistema inmunoregulator actúa, como hemos visto, en cadena, de forma que la modulación de un elemento puede alterar el sistema entero. Esto, que parece constituir una adversidad severa, pudiera ser ventajoso. De la misma manera que en la endometriosis se reconocen desviaciones de varios de los componentes del sistema inmune, cuyo origen probablemente sea único, así también la modulación del elemento clave pudiera establecer cambios en la red que devolvieran al sistema el orden fisiológico perdido. Sustancias como Procodazol (estimulante de la fagocitosis macrofágica), Factor de crecimiento hematopoyético (estimulante de granulocitos), Timoestimulina (polipéptidos de timo bovino estimulantes de la respuesta inmunitaria celular), Interleukina-2 (linfocina con acciones estimuladoras sobre diversos elementos de la red inmunológica) o Interferones, podrían ser ensayadas con este objetivo.

En lo que nosotros conocemos, no existe precedente alguno sobre el empleo de Interferones en la endometriosis experimental o humana. Únicamente Braum, teniendo en cuenta las alteraciones inmunológicas presentes en esta enfermedad, sugirió que los activadores de los macrófagos, como los Interferones, quizás fuesen útiles junto a la terapia de supresión hormonal para

controlar y eliminar el crecimiento endometrial ectópico (404). Por otra parte, Wilson, teniendo en cuenta la disminución significativa en la actividad de las células "Natural Killer" en los estadios más severos de la endometriosis, indicó el potencial que algunos tratamientos inmunoestimulantes de estas células podrían tener en pacientes con endometriosis avanzada (599).

Cualquier argumentación sobre los posibles mecanismos por los que los Interferones han dado lugar a los resultados obtenidos ha de ser completamente especulativa. Si bien, determinados efectos de estas sustancias están claramente establecidos y suficientemente contrastados, otros no son aceptados de manera unánime e incluso pueden presentarse de manera opuesta dependiendo de las circunstancias.

El primer hecho relevante en este sentido, puesto de manifiesto en el primer experimento, fue la incapacidad del Interferón alfa 2b intraperitoneal, administrado en el momento de la realización de los autotrasplantes, para modificar el crecimiento endometriósico de forma significativa.

Uno de los más tempranos efectos reconocidos de los Interferones, sobre las respuestas inmunes in vivo mediadas por células, fue un retraso significativo en el rechazo de injertos de piel entre ratones no histocompatibles (600). El Interferón no sólo inhibió las reacciones de hipersensibilidad retardada, sino que también disminuyó la sensibilización cuando se administró previamente al agente sensibilizante (601). Hay ejemplos descritos sobre casos de disminución de la inmunidad celular acompañando a infecciones virales, en las que el Interferón se encuentra fuertemente implicado (517). Parece ser crítico el momento en que esta sustancia es administrada en relación con sus efectos sobre la inmunidad celular. Cuando se suministra previamente a la sensibilización con el antígeno produce una depresión de las respuestas mediadas por linfocitos T; sin embargo, cuando la administración se realiza posteriormente al contacto con el antígeno se registra un aumento de la inmunidad celulomediada (601). Otro tipo de respuestas proliferativas de los linfocitos T, como las mediadas in vitro por la adición de Fitohemaglutinina o Concanavalina A, son del mismo modo

suprimidas por los Interferones (602). Estos hallazgos sugieren que bajo ciertas condiciones, los Interferones pueden exhibir fuertes efectos antiproliferativos sobre los linfocitos T, análogos a los observados para los linfocitos B. Los argumentos previos justificarían la ausencia de efecto del Interferón alfa2b sobre la inducción de la endometriosis experimental.

La consecuencia directa del resultado anterior es la imposibilidad de utilizar Interferón de manera preventiva en este modelo. Probablemente en la clínica humana no se da esta circunstancia, debido a que la menstruación retrógrada es un fenómeno casi universal y la mayoría de las mujeres se encontrarían sensibilizadas a células endometriales desplazadas.

En los animales del segundo experimento, después de la aleatorización, no se apreciaron diferencias en los distintos aspectos analizados, ni en el grado adherencial, ni en el tamaño de la endometriosis por implante o por animal. Tampoco cada uno de estos grupos fue diferente en este aspecto al resto de los animales del estudio. Ello supone que los resultados encontrados no pueden ser achacados a diferencias preexistentes intergrupos.

Una dosis estándar intraperitoneal causó una reducción evidente del tamaño de las vesículas, sin provocar cambio en el grado adherencial. Parecieron reducirse fundamentalmente los implantes de grado II, pasando a grados I y 0. La reducción de los implantes de grado III fue menor.

La ausencia de cambio en el grado adherencial podría interpretarse como un efecto positivo del Interferón, ya que lo ocurrido en el grupo de control, y por lo tanto lo esperado en este grupo, era un incremento de las adherencias al sucederse las laparotomías.

A diferencia del Interferón alfa2b por vía intraperitoneal, la administración subcutánea, además de disminuir el tamaño de la endometriosis por implante y por animal, redujo también el grado adherencial por implante.

En resumen, ambas vías de administración con pauta corta y dosis estándar fueron igualmente efectivas para disminuir el tamaño de la endometriosis, pero el Interferón subcutáneo fue superior para reducir el grado adherencial por implante.

Es difícil creer que una exposición tan corta al fármaco pudiera provocar efectos tan evidentes. Para entender mejor los factores que gobiernan la acción protectora local del Interferón, Dianzani creó un modelo experimental, en fibroblastos humanos cultivados, donde estudiar las variables de tiempo y concentración bajo estimulación a temperatura corporal (37 grados centígrados). Contrariamente a las observaciones previas, realizadas en condiciones menos fisiológicas, a los 30 minutos de exposición de las células al Interferón ya se encontró resistencia a la infección vírica, que fue máxima a las 2-4 horas. Cortas exposiciones al Interferón también lo consiguieron. Con un minuto se logró un nivel de resistencia similar al conseguido en 30 minutos. Similares resultados se encontraron modificando la temperatura entre 34.5 y 40 grados centígrados, con cinco minutos de exposición (603). Aunque la dinámica de la creación de resistencia frente a la infección vírica es distinta de la que dió como resultado la reducción de los implantes de endometrio autotrasplantado, la investigación de Dianzani demuestra que pequeñas exposiciones a la sustancia son capaces de producir efectos rápidos. No obstante, la respuesta a una determinada dosis es una cuestión todavía no contestada, con algunos resultados contradictorios entre estudios *in vitro* y ensayos clínicos (604).

Los mecanismos por los que los Interferones pudieron influir sobre las adherencias son inciertos, como también lo son los factores que dan lugar a su génesis en la endometriosis. Se ha postulado que la lesión mesotelial junto con alteraciones de la actividad fibrinolítica debían participar en la formación de las adherencias en la enfermedad (605). Portz y cols. señalaron la colaboración de los radicales superóxido en la producción de adherencias (492). Fibronectina es una glicoproteína presente en el tejido conjuntivo, en el plasma y sobre la superficie de la mayoría de las células. Promueve la adhesión entre las superficies celulares, y generalmente está ausente en las células tumorales. Se

polimeriza dentro de las matrices insolubles y se une a la fibrina, al colágeno y a la heparina. Las matrices formadas por la polimerización de la fibronectina, guían el movimiento de las células en los embriones y en los procesos de curación de las heridas (373). Es evidente su participación en los fenómenos fibróticos y adherenciales orgánicos. Ya hemos visto como Kauma demostró que los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis producían cantidades de Fibronectina tres veces superiores que los de las mujeres sin la enfermedad (183). Factores de crecimiento y otros productos liberados por macrófagos activados también se han relacionado con la génesis de adherencias (606).

El Interferón modula la actividad del Factor de crecimiento epidérmico (EGF) a través de la regulación de la expresión de su receptor (EGF-r). Después de 48 horas de exposición al fármaco, la ligazón de de EGF a su receptor apareció fuertemente reducida (607). El tratamiento de células de riñón de vaca con Interferón alfa2 produjo una reducción en la afinidad de los receptores de EGF para su ligando y un marcado descenso en el número de receptores funcionantes de EGF, expresados sobre la superficie celular (608). La síntesis de colágeno es dificultada por los Interferones. Nanes demostró que la incorporación de hidroxiprolina al colágeno era impedida por Interferones (609). Otros efectos sobre fibroblastos podrían dificultar también los fenómenos fibróticos (610), pero su participación final en los fenómenos adherenciales es enigmática, ya que actúan sobre monocitos y macrófagos estimulando la fagocitosis y la liberación de radicales libres de oxígeno (efecto relacionado con la formación de adherencias) (611).

El estudio de la farmacodinamia del Interferón alfa2b sobre la endometriosis experimental, según la vía de administración, resultó sumamente interesante. Suministrado intraperitonealmente, presentó un fuerte efecto reductor inicial (máximo a los 6 días) que fue disminuyendo posteriormente hasta alcanzar al vigésimo día una meseta, estimada en el 20-25 % de disminución de tamaño. Este porcentaje de beneficio se mantuvo hasta por lo menos el día 120. De forma opuesta, cuando se administró por vía subcutánea, se comprobó un pobre efecto inicial que fue aumentando hasta alcanzar al vigésimo día, similarmente a la vía

intraperitoneal, una meseta en torno al 20-25 % de reducción de tamaño. También este porcentaje de beneficio se mantuvo, con ligera tendencia ascendente, hasta el día 120.

Ya hemos comentado cómo el diseño que hemos empleado para estudiar la dinámica de actuación del fármaco, al no ser lineal, introduce un sesgo que hemos de asumir. Sin embargo, la coherencia de los resultados obtenidos hace pensar que efectivamente la dinámica real sea de la forma descrita.

¿Qué explicación pueden tener estos hechos?.

Berek (612), realizó un ensayo clínico sobre el efecto de Interferón alfa2b suministrado por vía intraperitoneal en pacientes con cáncer de ovario. En este estudio pudo comprobar que los pacientes alcanzaron altas concentraciones locales de la sustancia, con mínima absorción sistémica y virtual ausencia de síntomas generales.

Cuando el Interferón se encuentra en la cavidad peritoneal, manifiesta rápidamente efectos antiproliferativos locales. Estos efectos se producen mientras la sustancia está presente y son dosis dependientes, siendo prontamente revertidos en su ausencia (613). Los efectos antiproliferativos reducirían inicialmente, de este modo, los implantes endometriósicos. El efecto inmunomodulador se manifiesta de forma más lenta. Como este efecto comprende no solamente acciones locales sobre los elementos inmunes presentes en un determinado lugar, sino acciones sistémicas con reclutamiento y génesis de nuevos elementos, es probable que para manifestar de forma completa el fenómeno necesite absorberse. La cavidad peritoneal, ya lo hemos visto, constituye un reservorio para Interferón. La absorción desde este lugar está retardada, resultando así inicialmente diferidos los efectos inmunomoduladores sistémicos, pero exaltados los antiproliferativos locales.

Cuando el Interferón se administra por vía sistémica, los efectos

antiproliferativos, en un determinado lugar alejado del punto de entrada, son menores por su menor concentración. Como las acciones inmunomoduladoras son de instauración más lenta, en un principio sólo se manifestaría un pequeño efecto antiproliferativo, fruto de la escasa presencia local de la sustancia. Más adelante, el efecto inmunomodulador se produciría de forma completa, y persistente según nuestros resultados, manifestándose finalmente la consecuencia definitiva.

Las pautas de tratamiento largas proporcionaron mayor beneficio que las cortas. En el experimento tercero, 15 dosis estándar consiguieron reducir el tamaño global de la endometriosis experimental en un 43%. El 38% de las vesículas mayores de grado 0 previamente a la administración del tratamiento, habían desaparecido macroscópicamente tres meses más tarde. Implantes de todos los tamaños experimentaron reducciones de tamaño, pero la probabilidad de desaparecer por efecto del tratamiento resultó escasa (4.17%) para los que tenían un grado III de crecimiento previo. Aunque en algunos grados el número de casos fue pequeño, se apreció una correlación negativa entre el tamaño de las vesículas antes del tratamiento y la probabilidad de desaparecer tras la aplicación de éste. Desaparecieron el 100% de las vesículas de grado I, el 60% de las de grado II y sólo el 4% de las de grado III.

Estos resultados eran previsibles. Ya Spiegel (604), hace 10 años, indicó que los resultados de los estudios clínicos sugerían ciertas recomendaciones sobre el modo óptimo de utilizar los Interferones. En ese momento señaló que dosis repetidas parecían ser más eficaces que dosis aisladas. El tamaño o desarrollo de la enfermedad a tratar podía jugar un papel importante en la determinación de la actividad del Interferón. Las respuestas tardías al tratamiento parecían ser la norma más que la excepción en la terapia con estas sustancias. Este autor propuso, como objetivo continuo para futuras investigaciones, definir mejor esas recomendaciones. Nuestros hallazgos son totalmente coherentes con las recomendaciones de Spiegel.

Aunque, en base a los resultados del segundo experimento, esperábamos una reducción del grado adherencial por implante y por animal

significativa en el tercer experimento, ésta no ocurrió. Resulta difícil argumentar sobre el hecho de que pautas cortas subcutáneas produzcan disminución del cuadro adherencial y las pautas largas no. No obstante, ya indicamos cómo para los Interferones se describen efectos tanto promotores de la formación adherencial, como obstaculizadores de la misma. La medicina está cargada de ejemplos en que una exposición breve a una condición provoca un efecto, y una exposición larga a la misma condición provoca el efecto contrario.

Dosis de 200.000 U en pauta larga no consiguieron mayor beneficio que la estándar de 100.000 U con la misma pauta. Pero 15 dosis de 50.000 U mostraron una eficacia cuantitativamente similar a la conseguida por las dosis más altas (cuarto experimento).

La reducción global de la suma del tamaño todas las vesículas fue mayor con 50.000 U (próxima al 50%), seguida por 100.000 U (43%) y finalmente 200.000 U (37%). Por otra parte, el porcentaje de desaparición de los implantes, por efecto del tratamiento, fue superior con 100.000 U (38%) que con las otras dos dosis (30%). Las diferencias, en cualquier caso, no fueron estadísticamente significativas.

Las relación dosis-respuesta no está todavía clarificada, y además puede variar enormemente según la patología de que se trate. Actualmente en la clínica se emplean pautas con amplios márgenes de dosificación, recomendándose de forma general, para adultos, entre 2 y 5 millones de unidades, tres veces por semana (614).

El empleo de Interferón beta no consiguió mejorar los resultados obtenidos con dosis equivalentes de Interferón alfa2b. En el quinto experimento comprobamos que la reducción del tamaño global de los implantes se situó en el 35%, y el porcentaje de desaparición de las vesículas fue del 27% con este tipo de Interferón. Esa reducción, aún siendo menor que las encontradas con cualquier dosis de Interferón alfa2b en pauta larga, no llegó a representar diferencia estadísticamente significativa con ellas.

A pesar de que ambos Interferones, alfa y beta, actúan fijándose al mismo receptor celular, se ha señalado que éste no responde idénticamente a cada uno de ellos. Esto puede explicar por qué los pacientes refractarios a un Interferón todavía responden al otro (615). También soporta este hecho diferencias en la proporción de la respuesta.

De otro modo, la acción del Interferón beta puede esperarse que sea más localizada ya que, al circular en pequeñas cantidades por el torrente sanguíneo, tiene una capacidad de distribución menor (616). Varios investigadores han recomendado, por ello, preferentemente su administración local (617).

Estos argumentos previos podrían justificar en parte la menor eficacia del Interferón beta, pero sin duda, la causa fundamental que pudo haber limitado su eficiencia habría de buscarse en la mayor especificidad de especie que presenta (514).

La composición glicoproteica de este Interferón, además de conferirle especificidad, supone un mayor riesgo de sensibilización. A la proteína habría que añadirle el compuesto hidrocarbonado, con lo que las posibilidades de que el huésped genere anticuerpos neutralizantes es doble.

Pese a todo, hubo un hecho destacable. Mientras que en ninguno de los grupos en que se administró Interferón alfa2b hubo diferencias entre la reducción de tamaño encontrada en la laparotomía de reestadaje y la encontrada en la laparotomía final, en el grupo tratado con Interferón beta el beneficio fue significativamente superior en la laparotomía final, al considerar el tamaño medio por animal en grados. Puede hacer pensar este hallazgo que Interferón beta tiene un efecto más lento que se incrementa con el paso del tiempo. Aunque también es verdad que esa fue una diferencia aislada que no se encontró al analizar otros aspectos, como el tamaño en milímetros, lo que sugiere más bien que se trató de un hecho casual relacionado con el sistema de clasificación en grados.

El estudio de los porcentajes de reducción de la endometriosis experimental, tanto por implante como por animal, nos permiten establecer algunas consideraciones respecto a los casos en que los Interferones no fueron efectivos.

En conjunto, 31 de los 218 implantes (13%) con crecimiento previo mayor de grado 0 y tratados con pautas largas, aumentaron ligeramente de tamaño o no se modificaron. Por contra, la circunstancia anterior ocurrió en el 31% de los implantes tratados con pautas cortas (70/225). Porcentajes similares se observaron al analizar en cada grupo el número de animales en que la terapia no mostró efecto, lo que nos lleva a considerar que es el individuo y no el implante aislado el que se muestra renuente al efecto terapéutico. Si eso fuese así, dosis continuadas harían respondedores a algunos animales insensibles a exposiciones breves al fármaco.

Cuando analizamos este mismo aspecto, comparando los animales que recibieron 15 dosis de 50.000 U de INF alfa 2b y los que recibieron la misma pauta de INF beta, observamos que, mientras todos los animales que recibieron INF alfa 2b presentaron en mayor o menor medida algún tipo de respuesta, el 27% de los tratados con INF beta no experimentaron beneficio tras el tratamiento. Es muy probable que la no modificación o crecimiento de algunas vesículas de animales tratados con INF alfa 2b haya ocurrido como consecuencia de circunstancias propias del implante y no por falta de respuesta global del animal. En ese sentido, el tamaño del implante antes del tratamiento se correlacionó inversamente con la intensidad de la respuesta al mismo. También es posible que un mayor grado de fibrosis perivesicular, presente en algunas vesículas, dificultase la actuación de los distintos elementos del sistema inmunológico. Otra explicación hipotética para este hallazgo la constituye el distinto grado de diferenciación que pueden exhibir los elementos celulares de cada implante. Las células endometriales epiteliales o estromales que estuviesen más diferenciadas mostrarían mayor número de receptores hormonales. Como estos animales conservaron su ciclo estral, las vesículas con mayor número de receptores hormonales presentarían una proliferación incrementada, debido a la

acción de los esteroides ováricos, que podría sobrepasar la capacidad del aclaramiento inmune. Más adelante comentaremos cómo la diferenciación celular puede ser aumentada por los Interferones.

Los efectos fundamentales de estas sustancias a los que hemos atribuido el beneficio hallado en la endometriosis experimental son el antiproliferativo y el inmunomodulador. Veamos qué mecanismos de acción han podido desplegar tales compuestos, en esta enfermedad, para conseguir los resultados obtenidos.

El mecanismo básico en la acción antiproliferativa de los Interferones es una reducción de la síntesis proteica y bloqueo de la traducción celular. Dichos efectos han sido comprobados sobre células endometriales humanas *in vitro* (618).

Otro mecanismo comprobado por el que los Interferones median acciones antiproliferativas consiste en la anulación del efecto mitogénico de los factores estimulantes del crecimiento.

En la endometriosis humana se han identificado diversas citocinas y factores proteicos, derivados de macrófagos peritoneales, células estromales del endometrio ectópico y fibroblastos mesoteliales, que manifiestan efectos mitogénicos y proliferativos sobre diversos componentes estructurales de los tejidos endometriósicos (619). Así Hornstein investigó la expresión de RNAm que codifica para factor de transformación del crecimiento alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y receptor de este último factor (EGF-r) en cultivos de células endometriales estromales humanas. Demostró que cultivos estromales de 1, 2 y 3 semanas de incubación eran positivos para los tres factores (620). Se ha comprobado que en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis existen glicoproteínas precipitables mitogénicas en cantidad significativamente superior que en mujeres sin la enfermedad (621).

Sharpe y Vernon (622), diseñaron un estudio experimental para

identificar la síntesis y secreción de proteínas mitogénicas por implantes de endometrio uterino ectópico de ratas maduras (endometriosis experimental), tratadas con esteroides. Utero, implantes endometriósicos y tejidos de control fueron incubados con L-metionina o D-glucosamina durante 48 horas. La síntesis de novo de proteínas liberadas al medio fue identificada por fluorografía y análisis de imágenes con computadora. Consiguieron demostrar la presencia de dos grupos de proteínas secretadas por los implantes endometriósicos, que denominaron Endo I (40-50 Kilodaltons de peso molecular) y Endo II (28-32 Kilodaltons). Estas proteínas no fueron secretadas por el endometrio uterino. Un tercer grupo de proteínas, previamente identificado en medio de cultivo uterino, fue sintetizado y excretado por las células de los implantes 24-48 horas más tarde que en los cultivos paralelos uterinos. La denominaron PUP-1 (70 Kilodaltons). Recientemente Whitworth (623) comprobó en la rata, que factores de crecimiento producidos "in situ", como factor de transformación del crecimiento beta, podían jugar un papel en el desarrollo y mantenimiento del tejido endometrial ectópico. Dejan claro estas investigaciones que la rata es un modelo adecuado para estudiar la influencia de fármacos sobre factores estimuladores de la proliferación celular, generados en tejidos endometriósicos o en su entorno.

Clemens demostró que Interferón alfa contrarrestaba las acciones mitogénicas de varios factores estimuladores del crecimiento, incluyendo factor estimulador del crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento epidérmico (517).

Un tercer mecanismo antiproliferativo de los Interferones es la inhibición de la expresión oncogénica.

Lo mismo en células endometriales que endometriósicas se ha demostrado la presencia de determinados oncogenes (418).

Las proteínas codificadas por los oncogenes pueden ser responsables de la estimulación del crecimiento celular por tres vías: 1. Estimulando la síntesis de factores de crecimiento. 2. Ocupando los receptores de estos factores. 3.

Actuando como sustancias intracelulares estimulantes del crecimiento. En el primer caso, Interferón antagonizó al oncogén "v-sis", estimulante del factor del crecimiento derivado de plaquetas. En el segundo grupo, el oncogén "v-erbB", que ocupa el receptor del factor de crecimiento epidérmico, fue reducido de forma significativa por tratamientos continuos con Interferón. El tercer grupo de oncogenes puede ser dividido en dos subgrupos, factores citoplasmáticos como "ras", y factores nucleares como "c-myc". Cinco grupos distintos reportaron que Interferón regula expresión de "c-myc". Dos de ellos encontraron que la regulación se realizaba a nivel postrascriptional, y uno a nivel de la transcripción. Un hallazgo interesante fue que mientras el tratamiento con Interferón alfa o beta redujo la expresión de "c-myc", Interferón gamma estimuló la expresión de este oncogén (517).

Finalmente, el efecto antiproliferativo se ve incrementado a través de las acciones de los Interferones sobre los distintos elementos del sistema inmunológico (Inmunomodulación).

El Interferón gamma ha probado su papel inmunoregulador in vivo por varias razones (624):

1. Él mismo es un producto de la respuesta inmune.
2. Puede ser usado con una base inmuno-específica tanto in vitro como in vivo.
3. Es un factor llave que tiene relaciones íntimas con un conjunto complejo de sustancias inmunoreguladoras (C2, C3, Interleukina-1, Interleukina-2, Linfotóxina).

En un estudio sobre pacientes infectados cutáneamente con *Leishmania mexicana*, durante la infección activa las células mononucleares sanguíneas periféricas no secretaron Interferón gamma, mientras que cuando se observó secreción de esta sustancia (1 a 6 meses después de la terapia) el estado clínico de los enfermos mejoró mucho (625).

Pero ¿Tienen realmente los Interferones alfa y beta capacidad

inmunomoduladora, o ésta sólo corresponde al Interferón gamma?.

Los Interferones alfa y beta son capaces de estimular las células del sistema macrofágico-monocitario, induciendo en ellas cambios morfológicos y funcionales, como producción de proteasas lisosómicas y de Interleukina-1 (514). La producción de factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos fue incrementada, en la rata, por el tratamiento de macrófagos peritoneales residentes con una mezcla de Interferones alfa y beta murinos (526).

Es cierto que en la endometriosis los macrófagos peritoneales se encuentran significativamente aumentados, pero ese incremento cuantitativo se ve influenciado por una disfunción de esta célula. El antagonista del receptor de Interleukina-1 (IL-1ra) es un inhibidor natural de IL-1 que bloquea la unión de esta citocina a su receptor. En un estudio (627), se investigó la actividad de IL-1ra en fluido peritoneal de mujeres con endometriosis, y la expresión de RNAm en macrófagos peritoneales de estas pacientes. Se obtuvo fluido peritoneal de 20 pacientes con la enfermedad y 18 mujeres con pélvis normal. La actividad de IL-1ra se detectó en el 35% de las mujeres con endometriosis y en el 17% de los controles. El nivel de actividad de IL-1ra fue significativamente mayor en el grupo de endometriosis y mostró tendencia a incrementarse con el progreso de la enfermedad. El nivel de actividad de IL-1ra en fluido peritoneal mostró una correlación positiva con la presencia de RNAm (que codifica para IL-1ra) en macrófagos peritoneales. Los resultados de este estudio sugieren que los macrófagos peritoneales de las mujeres con endometriosis pueden ser defectivos en la producción de Interleukina-1, elemento clave en iniciación de la cascada inmunológica. Itoh encontró, utilizando sondas de PCR (reacción de la Polimerasa en cadena), que los niveles de transcripción de IL-1, IL-1ra e IL-6 en macrófagos peritoneales fueron más elevados en pacientes con endometriosis que en controles sanos (628). El balance entre el nivel local de Interleukina-1 e Interleukina-1 receptor antagonista puede ser crítico en la inmunología del ambiente peritoneal y, como hemos visto, los Interferones mejoran este balance.

Se ha observado que los INFs alfa y beta humanos aumentan la

reactividad de los linfocitos T citotóxicos (629). Del mismo modo pueden inhibir la génesis de linfocitos T supresores (602, 630).

Oosterlynck y cols. (631), encontraron un aumento de linfocitos T supresores en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis en comparación con mujeres sanas ($p < 0.05$). En otro estudio se investigaron las poblaciones linfocitarias en el fluido peritoneal de pacientes con enfermedad severa, encontrando una marcada disminución del recuento de linfocitos T totales (632).

Independientemente de los aspectos cuantitativos de las distintas subpoblaciones de linfocitos T, en los que hay comunicaciones discordantes, la activación de dichos linfocitos T peritoneales parece ser defectuosa en las pacientes con endometriosis. También en la rata con endometriosis experimental se ha confirmado en fecha reciente ese aspecto, lo que vuelve a demostrar la validez del modelo para nuestra investigación (633). De nuevo los Interferones pudieran ejercer acciones compensatorias de estas alteraciones de la inmunidad celular.

Con respecto a la inmunidad humoral, siguiendo a la exposición a INF, Braun y Levy comprobaron en ratones una supresión de anticuerpos IgG (634). Estudios en pacientes tratados con INF alfa indicaron que el número de células B circulantes fue significativamente reducido durante el tratamiento (635).

En pacientes con endometriosis existe una exaltación de la inmunidad humoral con aumento de células B, anticuerpos antiendometriales, autoanticuerpos frente a elementos subcelulares y presencia de factor 3 del complemento en endometrio eutópico y ectópico (232, 636, 637). En el endometrio eutópico y en el endometrio autotrasplantado en la cavidad peritoneal de la rata, Isaacson y cols. (638), demostraron la presencia de factor 3 del complemento, concluyendo que la rata puede ser usada como modelo para investigar aspectos relacionados con la inmunidad humoral en la endometriosis.

Con relación a la participación de los Interferones como

moduladores de la actividad de las células citotóxicas espontáneas (NK), éste fue reconocido hace varios años. Durante este tiempo, un gran número de publicaciones han demostrado que en los sistemas humano y murino, in vivo e in vitro, la administración de Interferones provoca un aumento significativo de la actividad NK. El aumento de actividad se manifiesta por un aumento en el porcentaje de células diana lisadas, así como por la disminución de su tiempo de reciclaje (517, 639).

En la endometriosis humana está claramente confirmada una disminución de la actividad citotóxica de las células NK (640, 641). Con menos grado de consenso, algunos investigadores han anunciado también una disminución cuantitativa de células NK en el endometrio ectópico, determinada por métodos inmunohistoquímicos (642).

Matsubayashi (633), hace tan sólo unos meses, examinó mediante citometría de flujo la población de células inmunes en ratas con endometrio autotrasplantado, tanto en sangre periférica como en exudado peritoneal. Diseñó un estudio con varios grupos de animales. Ratas con endometriosis inducida, ratas no operadas y ratas con endometriosis fáltsamente provocada (implantes de grasa). Demostró que la población de células NK se encontraba disminuída de forma significativa en animales con endometriosis inducida, con respecto a los grupos de control.

Adicionalmente hay un número de observaciones que muestran que los Interferones modulan ciertas características de la superficie celular directamente relacionadas con la solvencia del sistema inmune. El reconocimiento de los elementos extraños por los linfocitos T está restringido por las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (HLA), y en concreto el de los T cooperadores por las de clase II y el de los T citotóxicos por las de clase I (526). Púés bien, los linfocitos humanos responden a Interferón alfa con un incremento en la expresión de antígenos del sistema HLA, lo que aumenta su eficiencia (516).

Entonces, toda esta información relatada indica o sugiere que los Interferones alfa y beta son moléculas llave para la inmunoregulación, y que sus acciones pueden amortiguar los defectos inmunes comunicados en pacientes con la enfermedad. Pero además, cada uno de esos defectos ha sido demostrado también en la rata con tejido endometrial autotrasplantado, lo que, con independencia de otras consideraciones de tipo metodológico, da soporte a nuestro estudio, a nuestros resultados y a nuestras conclusiones.

Comparar los resultados de esta investigación con los obtenidos en el tratamiento de la endometriosis experimental mediante otros procedimientos, resultaría útil. Sin embargo, las grandes diferencias en los diseños y en los métodos hacen muy difícil tal propósito. Hace 4 años, en nuestro Departamento, Quereda estudió, con una metodología similar a la nuestra, el efecto de la Triptorelina, Gestrinona y la asociación de ambas sobre la endometriosis experimentalmente inducida en la rata Wistar (428). En su trabajo encontró una reducción global del tamaño de la endometriosis del 57.40% con triptorelina, del 52.80% con la asociación y del 44% con Gestrinona. El porcentaje de desaparición de los implantes fue del 40.10% con Triptorelina, del 30.60% con Gestrinona y del 26.50% con la asociación. Los resultados obtenidos en nuestra investigación, entre 40 y 50% de reducción del tamaño global de la endometriosis y porcentajes de desaparición de los implantes entre 30 y 40% según las dosis empleadas, son ligeramente inferiores los conseguidos por el análogo, pero superponibles a los de Gestrinona y asociación Análogo-Gestrinona. Téngase en cuenta que las regresiones por implante citadas por algunos autores con la castración son del 50-60% (453, 541).

Demostración de la reducción del tamaño de la endometriosis experimental aparte, un hallazgo trascendente del presente estudio ha sido la persistencia del beneficio a lo largo del tiempo (120 días).

Las recidivas de la enfermedad tras la finalización del tratamiento son un tema asumido pero insuficientemente estudiado. En la endometriosis humana la tasa acumulada de recurrencias en cinco años fue del 53.40% (643).

No obstante, dicha tasa varió en dependencia del estadio inicial de la enfermedad. En un modelo murino, y con una metodología similar a la nuestra, Jones comprobó que el agonista reducía casi todos los implantes, pero la mayoría recidivaban en ocho semanas (438).

Una característica de los Interferones no mencionada hasta ahora es su capacidad para incrementar la expresión de receptores hormonales de estrógenos y progesterona en las células hormonodependientes. Se trata de un aspecto marginal de un fenómeno más amplio de estas sustancias, como es la promoción de la diferenciación celular en las células desdiferenciadas.

Sicca (644), evaluó el efecto de la administración in vivo de INF beta sobre receptores de estrógenos y progesterona, en muestras de cáncer de endometrio. Cuarenta y ocho pacientes postmenopáusicas, con cáncer de endometrio primario, fueron incluidas en el estudio y randomizadas para recibir inyecciones intramusculares de 2 millones de U (grupo A) ó 6 millones de U (grupo B) de INF beta, 3 veces por semana, durante una semana. Determinó los receptores, antes de la administración de INF beta, sobre tejido neoplásico obtenido bajo control histeroscópico; y sobre especímenes obtenidos en la cirugía después del tratamiento. La concentración de receptores de estrógenos aumentó en el grupo A en el 67% de los casos, y los de progesterona en el 74%. Las diferencias en el contenido de receptores entre muestras tratadas y no tratadas fueron altamente significativas. En el grupo B, los aumentos se produjeron en el 71% y 58% de los casos para receptores de estrógenos y de progesterona respectivamente. Estos hallazgos sugieren que los Interferones pueden modular la sensibilidad hormonal celular, a través de un incremento en la expresión de receptores para hormonas.

En el trabajo de Quereda (428), aproximadamente el 10% de los implantes tratados mediante supresión hormonal no modificaron en absoluto su tamaño, o incluso aumentaron a pesar del tratamiento. Interpretó el autor tal hallazgo como prueba de la independencia hormonal de dichos implantes, probablemente por la mayor desdiferenciación de los mismos y ausencia de

receptores hormonales. La posibilidad de asociación de ambas terapias (Interferón y análogos de la Gn-RH) abre una nueva perspectiva. El Interferón podría aumentar los receptores hormonales de las células endometriósicas, incrementando el espectro de acción de los fármacos supresores hormonales. Además actúan por mecanismos completamente distintos. Mientras que los supresores hormonales aportarían mayor eficacia, los Interferones añadirían la persistencia del beneficio en el tiempo. Sin restar importancia a nuestro trabajo, sino todo lo contrario, existen en base a él argumentos para proponer este tipo de sinergismo, ya sugerido de forma empírica por Braum en 1992.

De cualquier modo, los resultados de esta investigación son alentadores y permiten especular, con la prudencia debida ante hallazgos experimentales, sobre orientaciones futuras en el tratamiento de esta enfermedad.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONES

CONCLUSION PRINCIPAL

1. Los Interferones alfa 2b recombinante humano y beta humano reducen significativamente el tamaño de los implantes de endometrio autotrasplantados en la cavidad peritoneal de la rata Wistar (endometriosis experimental).

CONCLUSIONES ADICIONALES

2. La endometriosis experimental no se modifica con el paso del tiempo, y las laparotomías realizadas para valorar su tamaño no ejercen influencia sobre los implantes, en términos de crecimiento de los mismos. Las adherencias se incrementan tras laparotomías repetidas.

3. Una dosis de 100.000 U de Interferón alfa 2b recombinante humano, dejada en la cavidad peritoneal de la rata en el momento de la inducción de la endometriosis experimental, no produce efecto significativo sobre el crecimiento de los implantes de endometrio autotrasplantados.

4. La administración de Interferón alfa 2b recombinante humano en pauta corta (tres dosis de 100.000 U subcutáneas o una dosis de 100.000 U intraperitoneal) reduce el tamaño de las vesículas endometriósicas. Ninguna de ambas vías, subcutánea o intraperitoneal, es, en este sentido, más efectiva que la otra.

5. Cuando el Interferón alfa 2b recombinante humano se suministra por vía intraperitoneal produce una reducción máxima inicial del tamaño de los implantes (6 días), que disminuye hasta el vigésimo día. A partir de entonces, un porcentaje de reducción del 20-25% se mantiene en meseta durante, al menos, 120 días. Contrariamente, la vía subcutánea presenta un efecto mínimo inicial que aumenta hasta el vigésimo día, momento en el que alcanza una meseta de reducción del tamaño de los implantes del 20-25%, mantenido también hasta por lo menos el día 120.

6. Las pautas largas de tratamiento con Interferón alfa 2b recombinante humano subcutáneo (15 dosis) son más efectivas para reducir el tamaño de la endometriosis experimental que las pautas cortas (3 dosis), tanto por implante como por animal.

7. La dosis más eficaz parece situarse en 50.000 U por animal (200.000 U/Kg). Aumentar las dosis no produce mayor beneficio y supone incremento de los costes y posibilidad de efectos secundarios mayores.

8. A igualdad de dosis, pauta y vía de administración subcutánea, el Interferón beta humano no muestra mayor efectividad que el Interferón alfa 2b recombinante humano para disminuir el tamaño de los implantes de endometrio autotrasplantados en la cavidad peritoneal de la rata Wistar.

9. Ambos tipos de Interferón no producen efecto significativo sobre las adherencias, sin embargo, considerada la tendencia espontánea a aumentar que éstas presentan al sucederse las laparotomías, la ausencia de incremento adherencial tras tratamiento con Interferón podría interpretarse como una influencia favorable de los mismos.

10. El beneficio que se consigue con cualquier dosis, pauta, vía de administración o tipo de Interferón, es permanente durante, al menos, 120 días (tiempo de estudio).

11. La administración continuada de Interferones no sólo aumenta cuantitativamente la reducción del tamaño de las vesículas endometriósicas, sino que también reduce el porcentaje de implantes y animales refractarios a la terapia con respecto a las admistraciones únicas o breves. Aproximadamente un 30% de los implantes y una proporción similar de animales no responden al ser expuestos a pautas cortas de Interferón, porcentaje que se ve reducido al 13% de los implantes y 10% de los animales con el empleo de pautas largas de tratamiento.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. **Barbieri RL.** Endometriosis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1989; 12: 9-31.
2. **Di Lieto A, Albano G, Fimiani R, Pontillo M.** Expression of EGF-R in ovarian endometriosis and hormonal treatment. Tercer Congreso mundial de endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 22.
3. **Mathur S, Butler WJ, Chihal HJ, Isaacson KB, Gleicher N.** Target antigen(s) in endometrial autoimmunity of endometriosis. *Autoimmunity* 1995; 20: 211-222.
4. **Koninckx PR, Martin D.** Treatment of deeply infiltrating endometriosis. *Curr Opin Obstet Gyn* 1994; 6: 231-241.
5. **Acién P.** Endometriosis: Una enfermedad enigmática. *RIF* 1991; 8: 219-220.
6. **Comino Delgado R, Lubian López D.** Endometriosis: Concepto, historia natural y epidemiología. *RIF* 1995; 12: 231-242.
7. **Starseva NV.** Endometriosis is a new disease of civilization. Tercer Congreso mundial de endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 37.
8. **Demyttenare K, Nijs P, Oosterlynck D, Evers-Kiebooms G, Koninckx PR.** Coping style, natural killer activity and endometriosis. Tercer Congreso mundial de endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 46.
9. **D'Hooghe TM, Bambra CS, De Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR.** The prevalence of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*) increases with the duration of captivity. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75: 98-101.

10. **Ridley JH.** The histogenesis of endometriosis. A review of facts and fancies. *Obst Gynec Surv* 1968; 23: 1-35.
11. **Grahan H. (Pseudonym of Flack IH).** *Eternal eve*. Doubleday and Co., Inc. Garden City. New York 1951. Citado en la referencia 10.
12. **Breus C.** *Über wahre epithel führende cystenbildung in uterus myomen*. Franz Deuticke. Leipzig und Wien 1894. Citado en la referencia 10.
13. **Diesterweg A.** Ein fall von cystofibroma uteri verum. *Z Geburtshilfe* 1883; 9: 191-195.
14. **Von Recklinghausen F.** Ueber die adenocysten der uterustumoren und über reste des Wolffschen organs. *Deutsche Med Wochenschr* 1893; 19: 824-826.
15. **Von Recklinghausen F.** Ueber adenomyoma des uterus und er tuba. *Wien Klin Wochenschr* 1895; 29: 530-536.
16. **Von Recklinghausen F.** *Die adenomyoma und cystadenomyoma der uterus und tubenwandung*. Verlag von Augustus Hirschwald. Berlin 1896. Citado en la referencia 29.
17. **Iwanoff NS.** Drüsiges cystenhaltiges uterusfibromyom complicirt durch sarcom und carcinom. (Adenofibromyoma cysticum sarcomatodes carcinomatosum). *Monatsschr Geburtshilfe Gynäkol* 1898; 7: 295-300.
18. **Rusell WW.** Aberrant portions of the Müllerian duct found in an ovary. *Johns Hopckins Hospital Bull* 1899; 10: 8-10.
19. **Semmelink HB, De Josselin de Jong R.** Beitrag zur kenntnis der adenomyome des weiblichen genitalapparates. *Monatsschr Geburtshilfe Gynäkol* 1905; 22: 234-269.

20. **Savage S.** Haematoma of the ovary and its pathological connections with the ripening and the retrogression of the Graafian follicle. *Br Gynaecol J* 1906; 21: 285-305.
21. **Wolf EH.** Ueber "Haematoma ovarii". *Arkiv Gynäkol* 1907; 84: 211-243.
22. **Hedley JP.** Haematoma of the ovary, with reports of 18 cases. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 1910; 18: 294-311.
23. **Novak E.** Abdominal hemorrhage of ovarian origin. *J Am Med Assoc* 1917; 68: 1160-1162.
24. **Casler DB.** A unique, diffuse uterine tumor, really an adenomyoma, with stroma, but no glands. Menstruation after complete hysterectomy due to uterine mucosa remaining in the ovary. *Trans Am Gynecol Soc* 1919; 44: 69-84.
25. **Norris CC.** Ovary containing endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1921; 1: 831-834.
26. **Meyer R.** Ueber eine adenomatose wucherung der serosa in einer bauchnarde. *Z Geburtshilfe Gynäkol* 1903; 49: 32-41.
27. **Fujii S.** Metaplasia: Secondary mullerian system and endometriosis. Tercer Congreso mundial de endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 3.
28. **Smith RR.** Hemorrhage into the pelvis cavity other than those of ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1920; 1: 240-247.
29. **Benagiano G, Brosens I.** The history of endometriosis: identifying the disease. *Hum Reprod* 1991; 6: 963-968.
30. **Cullen TS.** Adenomyoma uteri diffusum benignum. *Johns Hopkins Hosp Rep* 1896; 6: 133-137.

31. **Cullen TS.** Adenomyoma des uterus. Verlag Von Augustus Hirschwald. Berlin 1903. Citado en la referencia 29.
32. **Cullen TS.** The distribution of adenomyomata containing uterine mucosa. Am J Obstet Gynecol 1919; 80: 130-138.
33. **Sampson JA.** Perforating hemorrhagic (chocolate) cyst of the ovary. Arch Surg 1921; 3:245-323.
34. **Sampson JA.** Heterotopic or misplaced endometrial tissue. Am J Obstet Gynecol 1925; 10: 649-664.
35. **Sampson JA.** Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol 1927; 14: 422-469.
36. **Meyer R.** Autobiography. A short abstract of a long life. Henry Schuman ed. New York 1949. 71.
37. **Novak E, TeLinde RW.** The endometrium of the menstruating uterus. JAMA 1924; 83: 900-911.
38. **Halban J.** Metastatic hysteroadenosis. Wien Klin Wchnschr 1924; 37: 1205-1209.
39. **Lattes R, Shepard F, Tovell H, Wylie R.** A clinical and pathologic study of endometriosis of the lung. Surg Gynec & Obst 1956; 103: 552-558.
40. **Watkins RE.** The presence of endometrial cells in peritoneal fluid. J Pacif Coast Soc Obst 1937; 7: 120-127.
41. **Hirsch EF, Jones HO.** The behavior of the epithelium in explants of human endometrium. Am J Obstet Gynecol 1933; 25: 37-41.

42. **Keettel WC., Stein RJ.** The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 440-445.
43. **TeLinde RW, Scott RB.** Experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 60: 1147-1173.
44. **Ridley JH, Edwards IK.** Experimental endometriosis in the human. *Am J Obstet Gynecol* 1958; 76: 783-796.
45. **Pellicer A, Ballesteros A.** Tratamiento quirúrgico de la endometriosis. En Carlos Simón y Camran Nezhat (Eds.). Cuaderno 2 de medicina reproductiva. Endometriosis. Ed. médica Panamericana. Madrid 1995. 297.
46. **Wharton L.** Conservative surgical treatment of endometriosis. *South Med J* 1929; 22: 267-270.
47. **Pancorbo Alonso MA.** Tratamiento farmacológico de la endometriosis. *Farmacoterapia* 1995; 12: 149-154.
48. **Karnaky KJ.** The use of stilbestrol for endometriosis. *South Med J* 1948; 41: 1109-1111.
49. **Haskins AL, Woolf B.** Stilbestrol induced hyper hormonal amenorrhea for the treatment of pelvis endometriosis. *Obstet Gynecol* 1955; 5: 113-116.
50. **Salmon UJ, Geist SH, Water RI.** Treatment of dismenorrhea with testosterone propionate. *Am J Obstet Gynecol* 1939; 38: 264-268.
51. **Hamblen EC.** Androgen treatment of woman. *South Med J* 1957; 50: 743-747.
52. **Kistner RW.** The use of never progestins in the treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1958; 75: 264-277.

53. **Greenblatt RB, Dmowski WP, Mahesh VB, Scholer HFL.** Clinical studies with antigonadotropin Danazol. *Fertil Steril* 1971; 22: 102-112.
54. **Buttram VC, Belve JB, Reiter R.** Interim report of a study of danazol for the treatment of endometriosis. *Fertil Steril* 1982; 37: 478-483.
55. **Meldrum DR, Chang RJ, Lu J, Vale W, Rivier J, Judd HL.** "Medical oophorectomy" using a long-acting GnRH agonist: a possible new approach to the treatment of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 1081-1086.
56. **Lemay A, Quesnel G.** Potential new treatment of endometriosis: reversible inhibition of pituitary-ovarian function by chronic intranasal administration of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist. *Fertil Steril* 1982; 38: 376-379.
57. **Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG.** Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151-154.
58. **Starseva NV.** Clinico-immunological aspects in genital endometriosis. *Akush Ginekol* 1980; 3: 23-29.
59. **Vigano P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M.** Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56: 894-899.
60. **Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR.** Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56: 45-51.
61. **Taylor PV, Maloney MD, Capbell JM, Skerrow SM, Nip MMC, Parmar R, Tate G.** Autoreactivity in women with endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 680-688.

62. **Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB.** Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 1981; 35: 696-698.
63. **Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS, Caudle MR.** Interferon gamma (INF-gamma) and interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32: 180-183.
64. **Melega C, Balducci M, Bulletti C, Galassi A, Jasonni VM, Flamigni C.** Tissue factors influencing growth and maintenance of endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 256-265.
65. **Lessey BA, Castelbaum AJ.** Integrin in the endometrium of women with endometriosis. *Brit J Obstet Gynaec* 1984; 102: 347-348.
66. **Tozzini RI.** Endometriosis, aún sin muchas respuestas. *RIF* 1991; 8: 221-222.
67. **Goldman MB, Cramer DW.** The epidemiology of endometriosis. *Current Concepts in Endometriosis* 1990: 15-31.
68. **Houston DE.** Evidence for the risk of endometriosis by age, race, and socioeconomic status. *Epi Reviews* 1984; 6: 167-191.
69. **Chang YS, Lee JJ, Moons SY, Kim JG.** Diagnostic laparoscopy in gynecologic disorders. *Asia-Oceania J Obstet Gynecol* 1987; 13: 29-34.
70. **Musich JR, Behrman SJ.** Infertility laparoscopy in perspective. Review of live hundred cases. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 143: 293-303.
71. **Liston WA, Bradford WP, Downie J, Kerr MG.** Laparoscopy in a general gynecologic unit. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 113: 672-677.

72. **Goldstein DP, de Chlnoky C, Emans SJ, Leventhal JM.** Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J Reprod Med* 1980; 24: 251-256.
73. **Hasson HM.** Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J Reprod Med* 1976; 16: 135-138.
74. **Liu DTY, Hitchcock A.** Endometriosis: Its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynecol* 1986; 93: 859-862.
75. **Wheeler JM, Malinak LR.** Does mild endometriosis cause infertility ?. *Semin Reprod Endocrinol* 1988; 6: 239-249.
76. **Mahmood TA, Templeton A.** Prevalence and genesis of endometriosis. *Hum Reprod* 1991; 6: 544-549.
77. **Parazzini F, Luchini L Vezzoli F.** Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: Results from a multicentric Italian Study. *Hum Reprod* 1994; 9: 1158-1162.
78. **Houston DE, Noller KL, Melton LJ, Selwyn BJ, Hardy RJ.** Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1979. *Am J Epi* 1987; 125: 959-969.
79. **McCarthy E.** Inpatient utilization of short-stay hospitals by diagnosis: United States, 1980. National Center for Health Statistics, series 13: Data from the National Health Survey, n° 74. 1982: 1683-1735.
80. **Cavanagh WV.** Fertility in the etiology of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 539-547.

81. **Miyazawa K.** Incidence of endometriosis among Japanese women. *Obstet Gynecol* 1976; 48: 407-409.
82. **Meigs JV.** Gynecology: endometriosis. *N Engl J Med* 1942; 226: 147-153.
83. **Scott RB, Te Linde RW.** External endometriosis the scourge of the private patient. *Ann Surg* 1950; 131: 697-720.
84. **Goodall JR.** "Endometriosis". Philadelphia. Lippincott. 1943. Citado en la referencia 67.
85. **Frey GH.** The familial occurrence of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1957; 73: 418-421.
86. **Ranney B.** Endometriosis IV. Hereditary tendency. *Obstet Gynecol* 1971; 37: 734-737.
87. **Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr.** Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 327-331.
88. **Schifrin BS, Erez S, Moore JG.** Teen-age endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 116: 973-980.
89. **Simpson JL.** "Disorders of sexual differentiation. Etiology and clinical definition". Academic Press. New York 1976. Citado en la referencia 67.
90. **Buttram VC.** Conservative surgery for endometriosis in the infertile female: a study of 206 patients with implications for both medical and surgical therapy. *Fertil Steril* 1979; 31: 117-122.
91. **Moen MH.** Endometriosis in women at interval sterilization. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1987; 66: 451-454.

92. **Schulman H, Duvivier R, Blattner P.** The uterine contractility index: a research and diagnostic tool in dysmenorrhea. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 1049-1058.
93. **Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum Sc.** The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 1985; 255: 1904-1908.
94. **Candiani GB, Danesino V, Gastaldi A, Parazzini F, Ferraroni M.** Reproductive and menstrual factors and risk of peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56: 230-234.
95. **Hanton EM, Malkasian GD, Dockery MB, Pratt JH.** Endometriosis in young women. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 98: 116-119.
96. **Parazzini F, La Vecchia C, Francheschi S, Negri E, Cecchetti G.** Risk factor for endometrioid, mucinous and serous benign ovarian cysts. *Int J Epidemiol* 1989; 18: 108-112.
97. **Cramer DW.** Epidemiology of endometriosis. In Wilson EA (ed): "Endometriosis". Alan R. Liss. New York 1987. 5-22.
98. **McMahon B, Trichopoulos D, Cole P, Brown J.** Cigarette smoking and urinary estrogens. *N Engl J Med* 1982; 307: 1062-1065.
99. **Boyden TW, Pamerter RW, Stanforth P, Rotkis T, Wilmore JH.** Sex steroids and endurance running in women. *Fertil Steril* 1983; 39: 629-632.
100. **Dizerega GS, Barber DL, Hodgen GD.** Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression. *Fertil Steril* 1980; 33: 649-653.

101. **Ranney B.** Endometriosis: pathogenesis, symptoms, and findings. Clin Obstet Gynecol 1980; 23: 865-874.
102. **Novak ER, Woodruff JD.** "Gynecologic and obstetric pathology, with clinical and endocrine relations". 8th ed. WB Saunders. Philadelphia 1979.
103. **Grimes DA, Lebolt SA, Grimes KR, Wingo PA.** Systemic lupus erythematosus and reproductive function: a case-control study. Am J Obstet Gynecol 1985; 153: 179-186.
104. **Gleicher N, El-Roey A, Confino E, Friberg J.** Is endometriosis an autoimmune disease ?. Obstet Gynecol 1987; 70: 115-122.
105. **Chial HJ, Mathur S, Holtz GL, Williamson HO.** An endometrial antibody assay in the clinical diagnosis and management of endometriosis. Fertil Steril 1986; 46: 408-411.
106. **Nichols TR, Lamb K, Arkins JA.** The association of atopic diseases with endometriosis. Am Allergy 1987; 59: 360-363.
107. **Ahlborg UG, Lipworth L, Titus-Ernstoff L, Hsieh CC, Hanberg A, Baron J, Trichopoulos D, Adami HO.** Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. Crit Rev Toxicol 1995; 25: 463-531.
108. **Eskenazi B, Kimmel G.** Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds II. Reproductive effects. Environ Health Perspect 1995; 103: 143-145.
109. **Cummings AM, Metcalf JL, Birnbaum L.** Promotion of endometriosis by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats and mice: Time dose dependence and species comparison. Toxicol Appl Pharmacol 1996; 138: 131-139.

110. **Wood DH, Yochmowitz MG, Salmon YL, Eason RL, Boster RA.** Proton irradiation and endometriosis. *Aviat Space Environ Med* 1983; 54: 718-724.
111. **Rock JA, Markham SM.** Pathogeny of endometriosis. *Lancet* 1992; 340: 1264-1267.
112. **Jenkins S, Olive D, Haney A.** Endometriosis: Pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 155: 1154-1159.
113. **Redwine DB.** The distribution of endometriosis in the pelvis by age groups and fertility. *Fertil Steril* 1987; 47: 173-175.
114. **Lerma E, Prat J.** Endometriosis: Anatomía patológica y relación endometriosis-carcinoma. *RIF* 1995; 12: 243-247.
115. **Murphy AA, Green WR, Bobbie D, de la Cruz ZC, Rock JA.** Unsuspected endometriosis documented by scanning electron microscopy in visually normal peritoneum. *Fertil Steril* 1986; 46: 522-524.
116. **Martin DC, Hubert GD, Vander Zwaag R, El-Zeky FA.** Laparoscopic appearances of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1989; 51: 63-67.
117. **Redwine DB, Yocom LB.** A serial section study of visually normal pelvic peritoneum in patiens with endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 54: 648-651.
118. **Jansen RPS, Russell P.** Non pigmented endometriosis: Clinical laparoscopic and pathologic definition. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1154-1159.
119. **Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR.** Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990; 53: 978-983.

120. **Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F.** Three-dimensional architectures of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57: 980-983.
121. **Dmowski WP, Radwanska E.** Current concepts on pathology, histogenesis and etiology of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 123: 29-33.
122. **Gallardo E, Guanes PP, Valbuena D, Simon C.** Patología de la endometriosis: Líquido peritoneal, comparación del endometrio ectópico versus eutópico. En Carlos Simón y Camran Nezhat (Eds.). Cuaderno 2 de medicina reproductiva. *Endometriosis*. Ed. Médica Panamericana. Madrid 1995. 227-239.
123. **Kapadia SB, Russak RR, O'Donnell WF, Harris RN, Lecky JW.** Postmenopausal ureteral endometriosis with atypical adenomatous hyperplasia following hysterectomy, bilateral oophorectomy, and long-term estrogen therapy. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 60-63.
124. **Matthews CJ, Redfern CPF, Hirst BH, Thomas EJ.** Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril* 1992; 57: 990-997.
125. **Stovall DW, Anners JA, Halme J.** Immunohistochemical detection of type I, III, and IV collagen in endometriosis implants. *Fertil Steril* 1992; 57: 984-989.
126. **Bergquist A, Ljumbert O, Myhre E.** Human endometrium and endometriotic tissue obtained simultaneously: a comparative histological study. *Int J Gynecol Pathol* 1984; 3: 135-145.
127. **Lessey BA, Metzger DA, Haney AF, McKarty KS Jr.** Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy. *Fertil Steril* 1989; 51: 409-415.

128. **Metzger DA.** Cyclic changes in endometriosis implants. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 11.
129. **Evers JLH, Willebrand D.** The basement membrane in endometriosis. *Fertil Steril* 1987; 47: 505-507.
130. **Czernobilsky B, Morris WJ.** A histologic study of ovarian endometriosis with emphasis on hyperplastic and atypical changes. *Obstet Gynecol* 1979; 53: 318-323.
131. **Mostoufizadeh M, Scully RE.** Malignant tumors arising in endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 1980; 23: 951-963.
132. **Márquez Ramirez M, Jou Collell P.** Valoración histopatológica de la endometriosis. *RIF* 1989; 6: 259-265.
133. **Young RH, Prat J, Scully RE.** Endometrioid stromal sarcomas of the ovary. A clinicopathological analysis of 23 cases. *Cancer* 1984; 53: 1143-1155.
134. **Leiman G, Markowitz S, Veiga-Ferreira M, Margolius K.** Endometriosis of the rectovaginal septum: Diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 1986; 30: 313-316.
135. **Novo A.** Endometriosis: Clínica general y diagnóstico. *RIF* 1995; 12: 277-282.
136. **García C, David S.** Pelvic endometriosis and pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 129: 740-747.
137. **Fedele L, Parazzini F, Bianchi S, Arcaini L, Candiani GB.** Stage and localization of pelvic endometriosis and pain. *Fertil Steril* 1990; 53: 155-158.

138. **Quereda F, Lloret M, Brotons J, Barragán JC, Acién P.** Diagnóstico clínico, analítico y ecográfico de la endometriosis. RIF 1992; 9: 117-123.
139. **Remohí J, Guanes PP.** Aspectos clínicos de la endometriosis. En Carlos Simón y Camran Nezhat (Eds). Cuaderno 2 de medicina reproductiva. Endometriosis. Ed. Médica Panamericana. Madrid 1995. 241-254.
140. **Galle P.** Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1989; 16: 29-42.
141. **Reiter RC.** Dolor pélvico crónico. Prefacio. Clin Obst Gin 1990; Vol 1: 117-118.
142. **Kinch RAH.** Enigmatic pelvic pain. Contemp Ob Gyn 1987; 30: 51-58.
143. **Nesbitt R, Rizk P.** Uterosacral ligament syndrome. Obstet Gynecol 1971; 37: 730-733.
144. **Ripps B, Martin D.** Focal tenderness, pelvic pain and dysmenorrhea in endometriosis. J Reprod Med 1991; 36: 470-472.
145. **Ferreira S, Nakamura M, Salette De Abreu Castro M.** The hyperalgesic effect of prostacyclin and prostaglandin E2. Prostaglandins 1978; 16: 31-37.
146. **Badawy S, Marshall L, Gabal A, Nusbaum ML.** The concentration of 13, 14-dihydro-15-Keto-Prostaglandin F2 alpha and prostaglandin E2 in peritoneal fluid of infertile patients with and without endometriosis. Fertil Steril 1982; 38: 166-170.
147. **Drake T, O'Brien W, Ramwell P, Metz SA.** Peritoneal fluid thromboxane B2 and 6-Keto-prostaglandin F1 alpha in endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1981; 140: 401-404.

148. **Vernon MW.** Cellular activity: In vitro studies and in vivo models of endometriosis. Tercer Congreso mundial de endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 48.
149. **Wentz AC.** Premenstrual spotting: its association with endometriosis but not luteal phase inadequacy. *Fertil Steril* 1980; 33: 605-609.
150. **Tsukahara Y, Satoh M, Kato J, Fukamatsu Y, Funamoto H, Kitahara T, Fukuta T.** Clinicopathologic investigation of ovarian endometriosis: A comparative study of cystic and non-cystic types. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1985; 37: 751-757.
151. **Acién P.** Papel de la endometriosis en la esterilidad de origen desconocido. *RIF* 1991; 6: 29-37.
152. **Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ III.** Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril* 1982; 38: 667-672.
153. **Guzick DS.** Clinical epidemiology of endometriosis and infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989. 16: 43-59.
154. **Jansen RPS.** Minimal endometriosis and reduced fecundability. Prospective evidence from an artificial insemination by donor program. *Fertil Steril* 1986; 46: 141-143.
155. **Pauertein CJ.** Clinical presentation and diagnosis. In Schenken RS ed. *Endometriosis: contemporary concepts in clinical management.* JB Lippincot. Philadelphia 1989: 127-124.
156. **Metzger DA, Haney AF.** Endometriosis: Etiology and pathophysiology of infertility. *Clin Obstet Gynecol* 1988; 31: 801-812.

157. **Portuondo JA, Echanojauregui AD, Herran C, Alijarte I.** Early conception in patients with untreated mild endometriosis. *Fertil Steril* 1983; 39: 22-25.
158. **Rodríguez-Escudero FJ, Neyro JL, Corcostegui B, Benito JA.** Does minimal endometriosis reduce fecundity?. *Fertil Steril* 1988; 50: 522-524.
159. **Grant A.** Additional sterility factors in endometriosis. *Fertil Steril* 1966; 17: 514-519.
160. **Soules MR, Malinak LR, Bury R, Pondexter A.** Endometriosis and anovulation: A coexisting problem in the infertile female. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125: 412-417.
161. **Koninckx PR, Ide P, Vandenbrouche W, Brosens IA.** New aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. *J Reprod Med* 1980; 24: 257-261.
162. **Muse KN, Wilson EA.** How does mild endometriosis cause infertility?. *Fertil Steril* 1982; 38: 145-150.
163. **Cheesman KL, Cheesman SD, Chatterton RT, Cohen MR.** Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril* 1983; 43: 590-595.
164. **Ronnberg L, Kauppila A, Rajaniemi H.** Luteinizing hormone receptor disorder in endometriosis. *Fertil Steril* 1984; 42: 64-68.
165. **Fazleabas AT, Khan-Dawood FS, Dawood MY.** Protein, progesterone, and protease inhibitors in uterine and peritoneal fluids of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1987; 47: 218-224.

166. **Devoto L, Cohen P, Peralta B, Vega M, Fuentes A, Alba F, Sir T.** Determinantes endocrinológicos de la insuficiencia lútea en pacientes con endometriosis severa. *RIF* 1993; 10: 285-291.
167. **Ayers JWT, Birendaum DL, Menon KMJ.** Luteal phase dysfunction in endometriosis: elevated progesterone levels in peripheral and ovarian veins during the follicular phase. *Fertil Steril* 1987; 47: 925-929.
168. **Weed JC, Arquembourg PC.** Endometriosis: Can it produce an autoimmune response resulting in infertility?. *Clin Obstet Gynecol* 1980; 23:259-265.
169. **Confino E, Harlow L, Gleicher N.** Peritoneal fluid and serum autoantibody levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 53: 242-245.
170. **Damewood MD, Hesla Js, Schlaff WD, Hubbard M, Gearhart JD, Rock JA.** Effect of serum from patients with minimal to mild endometriosis on mouse embryo development in vitro. *Fertil Steril* 1990; 54: 917-920.
171. **Abu-Musa A, Takahashi K, Kitao M.** The effect of serum obtained before and after treatment for endometriosis on in vitro development of two-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1992; 57: 1098-1102.
172. **Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB.** Macrophages and infertility: Oviductal macrophages are potential mediators of infertility. *Fertil Steril* 1983; 39: 310-315.
173. **Morcos RN, Gibbons WE, Findley WE.** Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of two-cell mouse embryos: Possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1985; 44: 678-683.

174. **Oak MK, Chantler EN, Williams CA, Elstein M.** Sperm survival rates in peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and unexplained infertility. *Clin Reprod Fertil* 1985; 3: 297-303.
175. **Sueldo CE, Lambert H, Steinleitner A, Rathwick G, Swanson J.** The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on murine sperm-oocyte interaction. *Fertil Steril* 1987; 48: 697-699.
176. **Canales ES, Del Rocio P, Montoya R.** Efecto del líquido peritoneal nativo y ultrafiltrado de pacientes con endometriosis pélvica sobre la motilidad espermática in vitro de sus cónyuges. *Ginecol Obstet Mex* 1991; 59: 93-96.
177. **Coddington CC, Oehninger S, Cunningham DS, Hansen K, Sueldo CE, Hodgen Gd.** Peritoneal fluid from patients with endometriosis decreases sperm binding to the zona pellucida in the hemizona assay: A preliminary report. *Fertil Steril* 1992; 57: 783-786.
178. **Suginami H, Yano K.** An ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid: an OCI-related membrane responsible for fimbrial failure of ovum capture. *Fertil Steril* 1988; 50: 648-653.
179. **Sawada T, Tajima T, Tada S, Tanaka N, Kawakami S.** Embryonic development inhibitory factor (EDIF) in peritoneal fluid in patients with endometriosis. Tercer Congreso mundial de endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 28.
180. **Hill JA, Haimovici F, Anderson DJ.** Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. *J Immunol* 1987; 139: 2250-2254.
181. **Fakih H, Bagget B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO.** Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1987; 47: 213-217.

182. **Prough SG, Aksel S, Gilmore SM, Yeoman RR.** Peritoneal fluid fractions from patients with endometriosis do not promote two-cell mouse embryo growth. *Fertil Steril* 1990; 54: 927-930.
183. **Kauma S, Clark MR, White C, Halme J.** Production of fibronectin by peritoneal macrophages and concentration of fibronectin in peritoneal fluid from patients with and without endometriosis. *Obstet Gynecol* 1988; 72: 13-18.
184. **Ueki M, Tsurunaga T, Ushiroyama T, Ueda M.** Macrophage activation factors and cytokines in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1994; 20: 427-431.
185. **Koumantakis E, Matalliotakis I, Neonaki M, Froudarakis G, Georgoulas V.** Soluble serum interleukin-2 receptor, interleukin-6 and interleukin -1a in patients with endometriosis and in controls. *Arch Gynecol Obstet* 1994; 255: 107-112.
186. **Klein NA, Pérgola GM, Tekmal RR.** Cytokine regulation of cellular proliferation in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 1994; 734: 322-332.
187. **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR.** Transforming growth factor beta activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 287-292.
188. **Abae M, Glassberg M, Majercik MH, Yoshida H, Vestal R, Puett D.** Immunoreactive endothelin-1 concentrations in follicular fluid of women with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization embryo transfer. *Fertil Steril* 1994; 61: 1083-1087.
189. **Rier SE, Parsons AK, Becker JL.** Altered interleukin-6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61: 294-299.

190. **Akoum A, Lemay A, Brunet C, Hebert J.** Secretion of monocyte chemotactic protein-1 by cytokine stimulated endometrial cells of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 63: 322-328.
191. **Leach RE, Arneson BW, Ball GD, Ory SJ.** Absence of antisperm antibodies and factors influencing sperm motility in the cul-de-sac fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 53: 351-353.
192. **Wheeler JM, Johnston BM, Malinak MR.** The relationship of endometriosis to spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1983; 39: 656-660.
193. **Groll M.** Endometriosis and spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1984; 41: 933-935.
194. **Oliveira N, Pellicer A, Remohí J, Cano F, Simón C.** Alteración del desarrollo embrionario precoz en pacientes con endometriosis. *Prog Obst Gin* 1995; 38: 465-470.
195. **Acién P, Lloret M, Graels M.** Prolactin and its response to the LH-RHTRH test in patients with endometriosis before, during, and after treatment with Danazol. *Fertil Steril* 1989; 51: 774-780.
196. **Comite F, Delman M, Hutchinson-Willians K, De Cherney AH, Jensen P.** Reduced bone mass in reproductive-aged women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 837-842.
197. **Lane N, Baptista J, Orwoll E.** Bone mineral density of the lumbar spine in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 55: 537-542.
198. **Revilla M, Perera S, Arribas I, Arnanz F, Iritia M, Rico H.** Valores de masa ósea y endometriosis: Resultados preliminares. *RIF* 1992; 9: 127-131.

199. **Syrop CH, Halme J.** Cyclic change of peritoneal fluid parameters in normal and infertile patients. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 416-418.
200. **Chervenak FA, Greenlee RM, Lewenstein L, Tovell HM.** Massive ascites associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 379-382.
201. **Halme J, Chafe W, Currie JL.** Endometriosis with massive ascites. *Obstet Gynecol* 1985; 65: 591-593.
202. **Foster DC, Stern JL, Buscema J, Rock JA, Woodruff JD.** Pleural and parenchymal pulmonary endometrioma. *Obstet Gynecol* 1981; 50: 552-556.
203. **Horsfield K.** Catamenial pleural pain. *Eur Respir* 1989; 2: 1013-1014.
204. **Thibodkan LL, Priolean GR, Mandelifie EB, Merino MJ, Maethel MD.** Cerebral endometriosis: case report. *J Neurologic* 1987; 66: 609-610.
205. **Denton RO, Shertill JD.** Sciatic syndrome due to endometrioma of sciatic nerve. *South Med J* 1955; 43: 1027-1031.
206. **Junceda E.** Diagnóstico de la endometriosis. En Junceda Abello E. (Ed.) *Diagnóstico en Obstetricia y Ginecología*. Ed. Richard Grandío. Oviedo 1971. 245-247.
207. **Swolin K, Skogsberg Ch.** Endometriosis and basal body temperature. A new and simple diagnostic method. Preliminary report. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985; 64: 617.
208. **Shaltout F, Swolin K.** Basal body temperature curve and endometriosis. *Proc XIIIth World Congress Fertil Steril*. Marrakesh 1989. 35.
209. **Chai S, Wild R.** Basal body temperature and endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 54: 1028-1031.

210. **Swolin K.** Endometriosis detected by basal body temperature. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 29.
211. **Schwartz PE.** Utilidad de los marcadores tumorales en diagnóstico preoperatorio de quistes ováricos. Clin Obst Gin 1993; Vol II: 369-378.
212. **Kamerer Doak DN, Magriñá JF, Nemiro JS, Lidner TK.** Bening gynecologic conditions associated with CA 125 level > 1000 u/ml. A case report. J Reprod Med 1996; 41: 179-182.
213. **Barbieri RL.** CA-125 in patients with endometriosis. Fertil Steril 1986; 45: 767-769.
214. **Pittaway DE, Fayez JA.** The use of CA 125 in the diagnosis and management of endometriosis. Fertil Steril 1986; 46: 790-795.
215. **Wild RA, Hirisave V, Bianco A, Podczaski ES, Demers LM.** Endometrial antibodies versus CA 125 for the detection of endometriosis. Fertil Steril 1991; 55: 90-94.
216. **Koninckx PR, Riittinen L, Seppala M, Cornillie FJ.** CA 125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis. Fertil Steril 1992; 57: 523-530.
217. **Takahashi K, Yoshino K, Nagata H, Kusakari M, Kitao M.** CA-125 is an effective marker for patients with external endometriosis and on Danazol: case report. Fertil Steril 1988; 50: 173-175.
218. **Pittaway DE.** The use of serial CA 125 concentrations to monitor endometriosis in infertile women. Am J Obstet Gynecol 1990; 163: 1032-1037.

219. **Acién P, Shaw RW, Irvine L, Burford G, Gardner R.** CA 125 levels in endometriosis patients before, during and after treatment with danazol or LHRH agonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989; 32: 241-246.
220. **Franssen AMHW, Van der Heijden PFM, Thomas CMG, Doesburg WH, Willesen WNP, Rolland R.** On the origin and significance of serum CA-125 concentrations in 97 patients with endometriosis before, during, and after buserelin acetate, nafarelin, or danazol. *Fertil Steril* 1992; 57: 974-979.
221. **Cetin T, Vardar MA, Demir C, Burgut R.** Etiology of serum CA 125 in patients with endometriosis treated with a gonadotrophin-releasing hormone agonist (Buserelin). *Gynecol Obstet Inves* 1994; 38: 249-252.
222. **Deprest J, Cornillie F, Muyltermans M, Meulemans C, Koninckx PR.** CA 125 levels in "chocolate" cyst fluid are useful in differentiation of endometrioma and corpus luteum cyst. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 70.*
223. **Hornstein MD, Thomas PP, Gleason RL, Barbieri RL.** Menstrual cyclicity of CA 125 in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 279-283.
224. **Wijman MJNC, Bon GG, Hompes PGA, Verstraeten A, Kamp van GJ, Cornillie FJ, Kenemans P.** Evaluation of a new radioimmunoassay for the detection of CA 125 in sera of healthy control and infertility patients with and without endometriosis. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 71.*
225. **Mathur S, Peress RS, Williamson HO, Youmans CD, Maney SA, Garvin AJ, Rush PF, Fudenberg HH.** Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 259-266.

226. **Barlow DH, Kennedy SH.** Immunity in endometriosis. *Prog Obst Gin* 1993; 36: 118-121.
227. **Badawy SZ, Cuenca V, Stizel A, Jacobs RD, Tomar RH.** Autoimmune phenomena in infertile patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 271-275.
228. **Wild RA, Shivers CA.** Antiendometrial antibodies in patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985; 8: 84-86.
229. **Kennedy SH, Sargent IL, Starkey PM, Hicks BR, Barlow DH.** Localization of antiendometrial antibody binding in women with endometriosis using a double-labelling immunohistochemical method. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97: 671-674.
230. **Huang K, Fenton S.** Detection of endometrial antibodies in sera of endometriosis patients using immunofluorescence microscopy and digital image enhancement. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 68.*
231. **Ota H.** Distribution of immunoglobulin G and complement components C3 and C4 in endometriotic tissue or endometrium in women with endometriosis or adenomyosis. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 6.*
232. **Kim JG, Kim CW, Moon SY, Chang YS, Lee JY.** Detection of antiendometrial antibodies in sera of patients with endometriosis by dual coloured, double labelling immunohistochemical method and western blot. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 80-87.
233. **Odukoya OA, Wheatcroft N, Weetman AP, Cooke ID.** The prevalence of endometrial immunoglobulin G antibodies in patients with endometriosis. *Hum Reprod* 1995;; 10: 1214-1219.

234. **Switchenko AC, Kaufman RS, Becker M.** Are there antiendometrial antibodies in sera of women with endometriosis?. *Fertil Steril* 1991; 56: 235-
235. **Mathur S, Chial HS.** Antiendometrial antibodies?. *Fertil Steril* 1992; 57: 704-705.
236. **Badawy SZ, Cuenca V, Freliech H, Stefanu C.** Endometrial antibodies in serum and peritoneal fluid on infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 53: 930-932.
237. **Dmowski WP.** Immunological aspects of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 1995; 50: 3-10.
238. **Fishman EK, Scatarige JC, Saksouk FA, Rosenshein NB, Siegelman SS.** Computed tomography of endometriosis. *J Comp Assist Tomogr* 1983; 76: 257-264.
239. **Arrivé L, Hricak H, Martin MC.** Pelvic endometriosis: MR imaging. *Radiology* 1989; 171: 687-693.
240. **Birnholz JC.** Endometriosis and inflammatory disease. *Seminargin Ultrasound* 1983; 4: 184-192.
241. **Bonilla-Musoles F, Blanes J, Bailao LA, Ballester MJ, Osborne N, Raga F, Machado L.** Ecografía abdominal, vaginal, doppler color transvaginal y tridimensional en el diagnóstico de la endometriosis. *RIF* 1995; 12: 283-299.
242. **Bajo Arenas JM, Olaizola JI, García Burgueño MJ, Martínez Navajas M, Rubias O, García Frutos A, Aguila Collantes F.** Sonografía de la endometriosis. En Bajo Arenas JM y Olaizola Llodio (Eds.). *Ecografía ginecológica*. Ed. Garsi S.A.. Madrid 1987. 153-161.

243. **Kurjak A, Kupesic S.** Scoring system for prediction of ovarian endometriosis based on trasvaginal color and pulsed Doppler sonography. *Fertil Steril* 1994; 62: 81-88.
244. **Masuzaki H.** A study of the diagnosis and treatment of the infertile patients with endometriosis externa by scoring. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1987; 36: 987-994.
245. **Matsuura K, Honda Y, Nishimura K, Yamamoto S, Furuki Y, Okamura H.** Scoring system for screening patients with endometriosis in infertile clinic. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1990; 42: 174-178.
246. **Jacob TZ.** The existence of biochemical endometriosis in idiopathic infertile women: A scoring system analysis of ratios of components in peritoneal fluid and serum. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 36.
247. **Dmowski WP.** Visual assesement of peritoneal implants for staying endometriosis: do number and cumulative size of lesions reflect the severity of a sistemic disease?. *Fertil Steril* 1987; 47: 382-384.
248. **Hoshiai H.** Laparoscopic studies for pelvic endometriosis in relation to sterility. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1989; 41: 990-999.
249. **Redwine DB.** The visual appearance of endometriosis and its impact on our concepts of disease. In Chadha DR, Buttram VC (Eds). *Current Concepts in Endometriosis*. Alan R Liss, Inc. New York 1990. 393-421.
250. **Tozzini RI, Pineda RL.** Nuevos aportes para el diagnóstico laparoscópico de la endometriosis. *RIF* 1992; 9: 197-203.
251. **Ordás J.** Laparoscopia como técnica diagnóstica en la endometriosis. Qué hacer y no hacer. *RIF* 1992; 6: 359-360.

252. **Brosens IA, Puttemans J, Deprest J.** The endoscopic localization of endometrial implants in the ovarian chocolate cyst. *Fertil Steril* 1994; 61: 1034-1038.
253. **Acosta AA, Sueldo CE.** Endometriosis. En Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F (Eds). *Reproducción Humana*. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid 1996. 171-194.
254. **Del Pozo J, Carreras M, Giralt E, Sostoa M, Puig F, Vázquez A.** Endometriosis. Lesiones atípicas en la adolescencia. *RIF* 1992; 9: 215-217.
255. **Stripling MC, Martin DC, Chatman DL, Vander Zwaag R, Poston WM.** Subtle appearances of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 49: 427-431.
256. **Redwine DB.** Peritoneal blood painting: an aid in the diagnosis of endometriosis?. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 865-866.
257. **Gleicher N, Karande V, Rabin D, Dudkiewicz A, Pratt D.** The bubble test: a new tool to improve the diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 923-926.
258. **Yang JC, Van Dick Smith JP, Van Vugt DA, Kennedy JC, Reid RL.** Fluorescence and photosensibilization of experimental endometriosis in the rat after systemic 5-aminolevulinic acid administration : a potential new approach to the diagnosis and treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 154-160.
259. **Nezhat C, Nezhat F.** Reliability of the visual diagnosis of ovarian endometriosis?. *Fertil Steril* 1992; 58: 223-224.
260. **Giménez J.** Estudio citopatológico del ovario normal y patológico. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante 1990. 129.

261. **Bühler KF.** Cytology for microscopical verification of endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 9.
262. **Beecham CT.** Classification of endometriosis. *Obstet Gynecol* 1966; 28: 437.
263. **Acosta AA, Butram VC Jr, Besh PK, Malinak LR, Franklin RR, Vanderheyden J.** A proposed classification of pelvic endometriosis. *Obstet Gynecol* 1973; 42: 19-25.
264. **Ingersoll FM.** Selection of medical or surgical treatment of endometriosis. *Clin Obst Gynecol* 1977; 20: 849-864.
265. **Kistner RW, Siegler AM, Behrman SJ.** Suggested classification for endometriosis. Relationship to infertility. *Fertil Steril* 1977; 28: 1008-1010.
266. **Butram VC Jr.** An expanded classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1978; 30: 240-242.
267. **Cohen MR.** Laparoscopy and the management of endometriosis. *J Reprod Med* 1979; 23: 81-84.
268. **The American Fertility Society.** Classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1979; 32: 633-634.
269. **The American Fertility Society.** Revised AFS classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1985; 43: 351-352.
270. **Ación P.** Endometriosis. *RIF* 1995; 12: 229-230 (editorial).
271. **Blasco L.** Endometriosis y clasificación. *RIF* 1995; 12: 303-307.

272. **Koninckx PR, Martin DC.** Deep endometriosis: A consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa?. *Fertil Steril* 1992; 58: 924-928.
273. **Nezhat F, Nezhat CC, Allan CJ, Metzger DA, Sears DL.** Clinical and histological classification of endometriomas. *J Reprod Med* 1992; 37: 771-776.
274. **Hull ME, Moghisi KS, Magyar DF, Hayes MF.** Comparison of different treatment modalities of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril* 1987; 47: 40-44.
275. **Olive DL, Haney AF.** Endometriosis associated infertility: A critical review of therapeutic approaches. *Obstet Gynecol Surv* 1986; 41: 538-555.
276. **Brosens IA.** Minimal endometriosis: Should it be treated?. *Prog Obst Gin* 1993; 36: 135-148.
277. **Parrilla JJ, Navarro JM, López E, Abad L, Acién P.** Endometriosis. Conducta médica. Manipulación endocrina. *RIF* 1995; 12: 309-326.
278. **Kauppila A, Rönnberg L, Ylikorkala O.** Prostaglandins biosynthesis inhibitors and endometriosis. *Prostaglandins* 1979; 18: 655-661.
279. **Cotte G.** Technique of presacral neurectomy. *Am J Surg* 1949; 78: 50-56.
280. **Black WT.** Use of presacral sympathectomy in the treatment of dysmenorrhea: a second look after 25 years. *Am J Obstet Gynecol* 1964; 89: 16-22.
281. **Pérez JJ, Redwine DB.** Laparoscopic presacral neurectomy. En Soderstrom RM (ed.). *Operative laparoscopy*. Raven Press. New York 1992. 157-160.

282. **Doyle JB.** Paracervical uterine denervation for dysmenorrhea. *Trans New Engl Obstet Gyne Soc* 1954; 8: 143-147.
283. **Donnez J, Nisolle M.** CO₂ laser laparoscopic surgery. *Ballière's Clin Obstet Gynaecol* 1989; 3: 525-532.
284. **The American Fertility Society.** Management of endometriosis in the presence of pelvic pain. *Fertil Steril* 1993; 60: 952-955.
285. **Walton LA.** A reexamination of endometriosis after pregnancy. *J Reprod Med* 1977; 19: 341-344.
286. **Luciano AA, Turksoy RN, Carleo JL.** Evaluation of oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol* 1988; 2: 323-327.
287. **Surrey ES, Halme J.** Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol and leuprolide acetate on endometrial estromal cell proliferation in vitro. *Fertil Steril* 1992; 58: 273-278.
288. **Kistner RW.** Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol North Am* 1989; 16: 157-160.
289. **Vercellini P, Ragni G, Trespidi L, Oldani S, Crosignani PG.** Does contraception modify the risk of endometriosis?. *Hum Reprod* 1993; 8: 547-551.
290. **Hornstein MD, Gleason RE, Barbieri RL.** A randomized double-blind prospective trial of two doses of gestrinone in the treatment of endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 53: 237-241.
291. **Remohí J, Levy M.** Tratamiento médico de la endometriosis. En Carlos Simón y Camran Nezhat (Eds.). Cuaderno 2 de medicina reproductiva. Endometriosis. Ed. Médica Panamericana. Madrid 1995. 255-269.

292. **Coutinho EM, Azadian-Boulanger F.** Treatment of endometriosis by vaginal administration of gestrinone. *Fertil Steril* 1988; 49: 418-422.
293. **Dmowski WP, Kaperawakis E, Scommegna A.** Variable effects of danazol on endometriosis at 4 low dose levels. *Obstet Gynecol* 1982; 59: 408-415.
294. **Steingold KA, Lu JKH, Judd HL.** Danazol inhibits steroidogenesis by the human ovary in vivo. *Fertil Steril* 1986; 45: 649-654.
295. **El-Roey A, Dmowski WP, Gleicher N, Radwanska E, Harlow L, Vinor Z, Tummon I, Rawlins RG.** Danazol but not gonadotropin-releasing hormone agonist suppresses autoantibodies in endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 864-868.
296. **Dickey RP, Curole DN, Taylor SN.** Estradiol target level in treating endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57: 1361-1362 (letter).
297. **Barbieri RL, Gordon AC.** Hormonal therapy of endometriosis: the estradiol target. *Fertil Steril* 1991; 56: 820-822.
298. **Igarashi M, Ogata F, Nogami Y, Takahashi Y, Taguchi H, Miyasaka M, Ando A, Kobayashi Y.** Local danazol therapy is more effective than oral danazol therapy for pelvic endometriosis or adenomyosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 38.
299. **Kaseki H, Ishikawa H, Igarashi T, Toyama K, Watanabe M, Ienaga S, Akira S, Araki T.** Intravaginal administration of Danazol for endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 40.
300. **Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L, White WF.** Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem Biophys Res Comm* 1971; 43: 393-399.

301. **Pellicer A.** Análogos de la GnRH en el tratamiento de la endometriosis. En Carlos Simón y Camran Nezhat (Eds.). Cuaderno 2 de medicina reproductiva. Endometriosis. Ed. Médica Panamericana. Madrid 1955. 271-296.
302. **Clayton RN.** Gonadotropin-releasing hormone: From physiology to pharmacology. Clin endocrinol 1987; 26: 361-384.
303. **Meldrum DR.** Management of endometriosis with gonadotropin-releasing hormone agonist. Fertil Steril 1985; 44: 581-582.
304. **Schriock E, Monroe SE, Henzl M, Jaffe RB.** Treatment of endometriosis with a potent agonist of gonadotropin-releasing hormone (nafarelin). Fertil Steril 1985; 44: 583-588.
305. **Fraser HM, Sandow J, Cowen GM, Lumsden MA, Haining R, Smith SK.** Long-term suppression of ovarian function by a luteinizing-hormone releasing hormone agonist implant in patients with endometriosis. Fertil Steril 1990; 53: 61-68.
306. **Garcia Aguirre S, Pérez Gonzalez J, Duque JA, Ajami A, Miñano A, Sánchez Rubio J.** Valor del acetato de leuprolide en el tratamiento de la endometriosis. RIF 1990; 7: 431-438.
307. **Dupont A, Dupont P, Belanger A, Mailoux J, Cusan L, Labrie F.** Hormonal and biochemical changes treatment of endometriosis with the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist triptorelin ethylamide. Fertil Steril 1990; 54: 227-232.
308. **Petit J, Miralles RM, Gine L, Rivera A, Bonnin R, Navarro MA, Balaguero L.** Eficacia de un agonista de la LHRH (Acetato de Leuprolide) en el tratamiento de la endometriosis. RIF 1991; 8: 253-261.

309. **Saltiel E, Garabedian-Ruffalo SM.** Pharmacologic management of endometriosis. *Clin Pharm* 1991; 10: 518-531.
310. **Toguchi H.** Formulation Study of leuprorelin acetate to improve clinical performance. *Clin Ther* 1992; 14: 121-130.
311. **Shaw RW.** Treatment of endometriosis. *Lancet* 1992; 340: 1267-1271.
312. **Kauppila A.** Changing concepts of medical treatment of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993; 72: 324-336.
313. **Bergquist IA.** Hormonal regulation of endometriosis and the rationales and effects of gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment: a review. *Hum Reprod* 1995; 10: 446-452.
314. **Lemay A, Lourdasamy M.** Gonadotrophin releasing hormone agonist suppressive treatment of ovarian function decreases serum LH-Beta and bioactive LH but maintains elevated levels of LH-alpha. *Clin Endocrinol* 1991; 34: 191-196.
315. **Pahwa GS, Kullander S, Vollmer G, Oberheuser F, Knuppen R, Emons G.** Specific binding test for gonadotrophin releasing hormone in human endometrial adenocarcinoma. *Eur J Obstet Gynecol* 1991; 41: 135-142.
316. **Jones RC.** The effect of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist on experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol Copenh* 1987; 114: 379-382.
317. **Koninckx PR, Muydermans M, Brosens IA.** Unexplained infertility: "Leuven" consideration. *Eur J Obstet Gynecol* 1968; 31: 821-824.

318. **Kettel LM, Murphy AA, Mortola JF, Liu JH, Ulmann A, Yen SS.** Endocrine responses to long-term administration of the antiprogestrone RU486 in patients with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56: 402-407.
319. **Han M.** Preliminary results of Gossipol treatment in the menopausal functional uterine bleeding, myoma, and endometriosis. *Acta Med Chin Acad Med Sci* 1980; 2: 167-170.
320. **Haber GM, Behelak YF.** Preliminary report of the use of Tamoxifen in the treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 582-586.
321. **Ford MR, Turner MJ, Wood C, Soutter WP.** Endometriosis developing during Tamoxifen therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 1119.
322. **Buckley CH.** Tamoxifen and endometriosis. Case report. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97: 645-646.
323. **Le Bouedec G, Kauffmann P, Pingeon JM, de Latour M, Lemesle P, Dauplat J.** Endometriose post-menopausique developpee sous tamoxifene. *Rev Fr Gynecol Obstet* 1991; 86: 407-410.
324. **Malinak CR, Hofstadler A, Del Junco DJ.** Recurrence of endometriosis after combined Gn-RH agonist-surgical therapy. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 20.
325. **Shaw RW.** An open randomized comparative study of the effect of goserelin depot and danazol in the treatment of endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58:265-272.
326. **Cirkel V, Ochs H, Schneider HPG.** A randomized, comparative trial of triptorelin depot and danazol in the treatment of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 59: 61-69.

327. **Evers JLH.** The second-look laparoscopy for evaluation of the results of medical treatment of endometriosis should not be performed during ovarian suppression. *Fertil Steril* 1987; 47: 502-504.

328. **Shaw RW.** A risk benefit assessment of drugs used in the treatment of endometriosis. *Drug Safety* 1994; 11: 104-113.

329. **Hickok LR, Burry KA, Cohen NL, Moore DE, Dahl KD, Soules MR.** Medical treatment of endometriosis: a comparison of the suppressive effects of danazol and nafarelin on reproductive hormones. *Fertil Steril* 1991; 56: 622-627.

330. **Lemay A, Brideau NA, Forest JC, Dodin S, Maheux R.** Cholesterol fractions and apolipoproteins during endometriosis treatment by a gonadotrophin releasing hormone (GnRH) agonist implant or by danazol. *Clin Endocrinol* 1991; 35: 305-310.

331. **Dodin S, Lemay A, Maheux R, Dumont M, Turcot-Lemay L.** Bone mass in endometriosis patients treated with GnRH agonist implant or danazol. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 410-415.

332. **Damarío MA, Rock JA.** Goserelina (Zoladex) versus Danazol in the treatment of endometriosis: the american experience. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 101: 13-18.

333. **Alonso AL, Bodega A, Carmona V, Segura C.** Análogos de la GnRH en el tratamiento de la endometriosis, efectividad y repercusiones sexológicas. *RIF* 1991; 8: 263-268.

334. **Wheeler JM, Knitte JD, Miller JD.** Depot leuprolide versus danazol in treatment of women with symptomatic endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 1367-1371.

335. **Coddington CC, Hassiakos DK, Harrison HC, Brzyski RG, Jones JS.** Effects of a gonadotrophin releasing hormone analogue on the glucose metabolism in a diabetic patient. *Gynecol Obstet Inves* 1990; 30: 246-248.
336. **The Nafarelin European Endometriosis Trial Group (NEET).** Nafarelin for endometriosis: a large-scale, danazol-controlled trial on efficacy and safety with one year follow-up. *Fertil Steril* 1992; 57: 514-522.
337. **Lindsay P, Shaw RW.** The effect of livial on GnRH agonist induced bone loss. Séptimo Congreso Internacional sobre Menopausia. Estocolmo 1993. Abstract 95.
338. **Murphy AA, Schlaff WD, Hassiakos D, Durmusoglu F, Damewood MD, Rock JA.** Laparoscopic cauterly in the treatment of endometriosis-related infertility. *Fertil Steril* 1991; 55: 246-251.
339. **Adamson GD, Subak LL, Pasta DJ, Hurd SJ, Von Franque O, Rodríguez BD.** Comparison of CO₂ laser laparoscopy with laparotomy for treatment of endometriomata. *Fertil Steril* 1992; 57: 965-973.
340. **Haney AF.** The risks/benefits of laparoscopic cauterly for endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 55: 243-245.
341. **Querleu D, Chapron C, Chevalier L, Bruhat M.** Complications of gynaecological laparoscopic surgery. A french multicentre collaborative study. *Gynaecol Endosc* 1993; 2: 3-6.
342. **Silverberg KM.** Combination therapy for endometriosis. *Infertil Reprod Med Clin NA* 1992; 3: 683-688.
343. **Thomas EJ.** Combining medical and surgical treatment for endometriosis: The best of both worlds?. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 5-8.

344. **Videla-Rivero L, Etchepareborda JJ, Lavarello M, Kesserü E.** Comparación de Gestrinona y Danazol en combinación con cirugía translaparoscópica en el tratamiento de la endometriosis. RIF 1993; 10: 221-226.
345. **Miralles RM, Petit J, Balaguero LL.** Endometriosis tumoral asociada a esterilidad. Eficacia del tratamiento combinado medico-quirúrgico. RIF 1993; 10: 497-498.
346. **Parazzini F, Fedele L, Busacca M, Falsetti L, Pellegrini S, Venturini PL, Stella L.** Postsurgical medical treatment of advanced endometriosis: Result of a randomized clinical trial. Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 1205-1207.
347. **Fedele L, Bianchi S, Marchini M, Villa L, Brioschi D, Parazzini F.** Superovulation with human menopausal gonadotrophins in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: a controled randomized study. Fertil Steril 1992; 58: 28-31.
348. **Damewood MD, Rock JA.** Treatment independent pregnancy with operative laparoscopy for endometriosis in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1988; 50: 463-465.
349. **García Aguirre S, Conzalez Batres E, Duque JA, Ballesteros ME, Roldán F, Maicas MA.** Fecundación in vitro y endometriosis: Influencia del tratamiento médico previo. RIF 1993; 10: 335-338.
350. **Barri PN, Coroleu B, Martínez F, Parera N, Veiga A, Calderón G, Aran B Belil I.** Endometriosis y fecundación in vitro. RIF 1995; 12: 341-345.
351. **Vergara F.** Manejo de la esterilidad asociada a la endometriosis. Prog Obst Gin 1993; 36: 136-144.
352. **Dmowski WP, Radwanska E.** Endometriosis and infertility. Acta Obstet Gynecol Scand 1984; 123: 73-77.

353. **Shushan A, Eisemberg VH, Schenker JG.** Subfertility in the era of assisted reproduction: changes and consequences. *Fertil Steril* 1995; 64: 459-469.
354. **Serafini P, Nelson J, Batzofin J.** Consideraciones contemporáneas y control terapéutico de la subfertilidad asociada a endometriosis. *RIF* 1993; 10: 475-486.
355. **Medical Research International, Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society.** In vitro fertilisation-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1989 from the IVF-ET Registry. *Fertil Steril* 1991; 55: 14-23.
356. **Rosen GF.** Treatment of endometriosis-associated infertility. *Infertil Reprod Med Clin NA* 1992; 3: 721-727.
357. **Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, De los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A.** Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994; 9: 725-729.
358. **Ordás J, Pérez-Piñar A.** Pautas actuales en el tratamiento de la endometriosis y recurrencias. *RIF* 1995; 12: 349-354.
359. **Venturini PL, Semino A, De Cecco L.** The biological basis of medical treatment of endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9: 259-266.
360. **Gleicher N.** Endometriosis: A new approach is needed. *Hum Reprod* 1992; 7: 821-824.
361. **Szlachter NB, Moskowitz J, Bigelow B, Weiss G.** Iatrogenic endometriosis: Sustantiation of the Sampson hypotesis. *Obstet Gynecol* 1980; 55: 529-531.

362. **Mungyer G, Willemsem WNP, Rolland R, Vemer HM, Ramaekers FCS, Jap PHK, Poels LG.** Cells of the mucous membrane of the female genital tract in culture: A comparative study with regard to the histogenesis of endometriosis. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 111-117.
363. **Kruitwagen RFPM, Poels LG, Willemsen WNP, de Ronde IJY, Jap PHK, Rolland R.** Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55: 297-303.
364. **Stowall DW, Halme J.** Endometriosis and associated pathology. *Curr Opin Obst Gyn* 1991; 3: 853-858.
365. **Nossal GJV.** The basic components of the immune system. *N Engl J Med* 1987; 316: 1320-1325.
366. **Simón C.** Inmunología de la endometriosis. En Carlos Simón y Camran Nezhat (Eds.). Cuaderno 2 de medicina reproductiva. Endometriosis. Ed. Médica Panamericana. Madrid 1995. 213-225.
367. **Fauci AS, Rosemberg SA, Sherwin SA, Dinarello CA, Longo DL, Lane HC.** Immunomodulators in clinical medicine. *Ann Inter Med* 1987; 106: 421-433.
368. **Ritz J.** The role of Natural Killer cells in immune surveillance. *N Engl J Med* 1989; 320: 1748-1749.
369. **Alvarez de Mon M, Duránte A.** Fisiopatología de las linfocinas y monocinas. *Med Clin* 1987; 89: 387-393.
370. **Schimpl A, Wecker E.** Replacement of T cell function by a T cell product. *Nature* 1972; 237: 15-17.

371. **Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R.** Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science* 1976; 193: 1007-1008.
372. **Dinarelli CA, Mier JW.** Lymphokines. *N Engl J Med* 1987; 317: 940-945.
373. **Rosen FS, Steiner LA, Unanue ER.** *Lexicon of immunology.* McMillan LTD ed.. London and Basgstroke 1989.
374. **Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I.** Interleukin-1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982; 128: 2177-2182.
375. **Alvarez Mon M, Kehrl JH, Fauci AS.** A potential role for neuroendocrine peptides in regulating human B lymphocytic functions. *Clin Res* 1985; 33: 608.
376. **Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, Kakinuma C, Nozawa S.** Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 220-228.
377. **Dmowski WP, Steele RW, Baker GF.** Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141: 377-383.
378. **Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ.** Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1984; 6: 33-36.
379. **Gleicher N, Dmowski WP, Siegel I, Liu TL, Friberg J, Radwanska E, Toder V.** Lymphocyte subsets in endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 463-466.
380. **Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ.** Characterization of leucocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 216-222.

381. **Badawy SZ, Cuenca V, Stitzel A, Tice D.** Immune rosettes of T and B lymphocytes in infertile women with endometriosis. *J Reprod Med* 1987; 32: 194-197.
382. **Cunningham DS, Hansen KA, Coddington CC.** Changes in T-cell regulation of responses to self antigens in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 114-119.
383. **Sukhikh GT, Nikolaeva MA, Volkov NI, Philippova RD.** Characterization of lymphocyte subpopulations in the blood and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 87.*
384. **Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Lee TY.** Peritoneal Natural Killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 2671-2675.
385. **Kennedy SH, Starkey PM, Hicks BR, Sargent IL, Barlow DH.** Immunoglobulins and complement proteins in the endometrium of women with and without endometriosis. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 74.*
386. **Mathur S, Chial HJ, Homm RJ, Garza DE.** Endometrial antigens involved in the autoimmunity of endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 860-863.
387. **Meek SC, Hodge DD, Musich JR.** Autoimmunity in infertile patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 1365-1373.
388. **Halme J, Mathur S.** Local autoimmunity in endometriosis. *Int J Fertil* 1987; 32: 309-311.

389. **Wild RA, Satyaswaroop PG, Shivers AC.** Epithelial localization of antiendometrial antibodies associated with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 13: 62-65.
390. **Günter RR, Tauber PF.** Cyclic variations of immunoglobulins G, A and M in endometriosis samples. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 83.
391. **Fernández-Shaw S, Hicks BR, Yudkin P, Kennedy SH, Barlow DH, Starkey PM.** Auto-antibodies to vascular endothelium in endometriosis and their relationship to infertility. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 76.
392. **Taylor PV, Maloney MD, Campbell JM, Skerrow SM, Nip MMC, Parmar R, Tate G.** Autoreactivity in women with endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 680-684.
393. **Abrao MS, Oliveira RM, Soares JB, Porto RC, Fonseca AM, Tognotti E, Grassotto OR, Bastos AC, Pinotti JA.** Humoral immunological alterations in endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 81.
394. **Kiechle FL, Quattrocioni-Longe TM, Brinton DA.** Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 611-615.
395. **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR.** The Natural Killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 290-295.
396. **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Lacquet FA, Waer M, Koninckx PR.** Flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994; 31: 25-31.

397. **Iwasaki K, Makino T, Maruyama T, Saito S, Umeuchi M, Matsubayashi H, Nozawa S.** Leucocyte subpopulations and Natural Killer activity in women with endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 85.
398. **Hill JA.** Immunology and endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 262-264.
399. **Hirata J, Kikuchi I, Imaizumi E, Tode T, Nagata I.** Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors. *Gynecol Obstet Inves* 1994; 37: 43-47.
400. **Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Muzzioli M, Di Stefano G, Fabris N.** Natural Killer activity in a stage III and IV endometriosis: impaired cytotoxicity and retained lymphokine responsiveness of natural killer cells. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9: 125-130.
401. **Provinciali M, DiStefano G, Muzzioli M, Garzetti GG, Ciavattini A, Fabris N.** Relationship between 17-beta-estradiol and prolactin in the regulation of natural killer cell activity during progression of endometriosis. *J Endocrinol Inves* 1995; 18: 645-652.
402. **Halme J, Becker S, Haskill S.** Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 783-789.
403. **Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JLH.** Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 707-710.
404. **Braum DP, Gebel H, Rotman C, Rana N, Dmowski WP.** The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57: 1203-1210.

405. **Fukumatsu Y, Makamura M, Katabuchi H, Matsuura K, Okamura H.** Evaluation of activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 29.
406. **Becker JL, Widen RH, Mahan CS, Yeko TR, Parsons AK, Spellacy WN.** Human peritoneal macrophage and T lymphocyte populations in mild and severe endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 179-187.
407. **Fukumatsu Y, Katabuchi H, Miyamura S, Matsuura K, Okamura H, Naito M, Takahashi K.** Activated macrophages in the peritoneal fluid of women with endometriosis: Examination of the intracytoplasmic localization of endogenous peroxidase and interleukin-1. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1992; 44: 529-536.
408. **Zhang R, Wild RA, Medders D, Gunupudi SR.** Effects of peritoneal macrophages from patients with endometriosis on the proliferation of endometrial carcinoma cell line ECC-1. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1842-1846.
409. **Dmowski WP, Gebel HM, Braum DP.** The role of cell mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994; 159: 7-14.
410. **Rier SE, Parsons AK, Becker JL.** Altered interleukin-6 production by peritoneal leucocytes from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61: 294-299.
411. **Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS, Caudle MR.** IL-1 beta, TNF alpha and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 381-385.

412. **Dmowski WP, Braum DP, Rotman C.** Aspectos inmunológicos de la endometriosis. En Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F (Eds). Reproducción Humana. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid 1966. 195-203.
413. **Halme JH, White C, Kauma S.** Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 1044-1049.
414. **Surrey ES, Halme J.** Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometriomal stromal cell proliferation in vitro. *Obstet Gynecol* 1990; 76: 792-797.
415. **Ferriam FA, Jones DSC, Prentice A, Thomas EJ, Smith SK.** Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 73.
416. **Halme J.** Growth factors in endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 50.
417. **Fernández-Shaw S, Marshall JM, Hicks BR, Naish CE, Barlow DH, Starkey PM.** Plasminogen activators in ectopic and uterine endometrium. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Abstract 78.
418. **Schenken RS, Johnson JV, Rao TR.** C-myc protooncogene in endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 5.
419. **Takemura M, Saji F, Azuma C.** Matrix metaloproteinase III activities in the ascites of endometriosis patient. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 70.

420. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, Smith SK.** Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98: 482-489.

421. **Ruoslahti E.** Integrins. *J Clin Invest* 1991; 87: 1-5.

422. **Lessey BA, Castelbaum A, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL.** Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 643-649.

423. **Gebel HM, Rana N, Braum DP, Dmowski WP.** Differential expression of VLA beta 1 (CD29) on monocytes from patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 317-322.

424. **Gebel HM, Braum DP, Markham PN, Rotsztejn DA, Dmowski wp.** Expression of CD29 (VLA B1) on monocytes from patients with endometriosis correlates with severity of diseases. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 31.

425. **Béliard A, Donnez J, Foidart JM.** Role of Laminin and Fibronectin in the implantation of peritoneal endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 75.

426. **D'Hoodge TM, Bambra CS, Cornillie FJ, Isahakia M, Koninckx PR.** Prevalence and Laparoscopic appearance of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *papio cynocephalus*). *Biol Reprod* 1991; 45: 411-416.

427. **D'Hoodge TM, Bambra CS, Isahakia M, Koninckx PR.** Spontaneous endometriosis in the baboon is moderately progressive with active remodeling over a 12 month period. Tercer Congreso Mundial de endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 63.

428. **Quereda F.** Comparación del efecto del tratamiento con Triptorelina, Gestrinona y la asociación de ambas, sobre la endometriosis experimentalmente inducida en la rata Wistar y su influencia en la fertilidad. En: Memoria de Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Alicante, 1993.
429. **Vernon MW.** Experimental endometriosis in laboratory animals as a research model. *Current Concepts in endometriosis*. Alan R. Liss Inc. 1990. 49-60.
430. **Hesselberg C, Kerwin W, Loeb L.** Auto and homoiotrasplantation of the uterus in the guinea-pig. *J Med Research* 1918; 38: 11-31.
431. **Jacobson VC.** The autotrasplantation of endometrial tissue in the rabbit. *Arch Surg* 1922; 5: 281-300.
432. **Allen E.** Endometrial trasplantation. *Am J Obstet Gynecol* 1932; 23: 343-350.
433. **Hobbs JE, Bortnick AR.** Endometriosis of the lungs. An experimental and clinical study. *Am J Obstet Gynecol* 1940; 40: 832-843.
434. **Weintein BB, Weed JC, Collins CG, Lock FR, Schlosser JV.** The effect of diethylstilbestrol dipropionate on endometrial trasplants. *Endocrinology* 1940; 27: 903-907.
435. **Sensening DM, Serlin O, Hawthorne HR.** Pericardial endometriosis. An experimental study in dogs. *JAMA* 1966; 198: 645-647.
436. **Daniel C, Williams-Boyle PK.** Surgical induction of endometriosis. En: *Methods in mammalian reproduction*. New York JC Daniel Acad Press 1978. 545.

437. **Vernon MW, Wilson EA.** Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1985; 44: 684-694.
438. **Jones RC.** The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) agonist (WY-40, 972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol Copenh* 1984; 106: 282-288.
439. **Sharpe KL, Zimmer RL, Khan RS, Penney LL.** Proliferative and morphogenic changes induced by the coculture of rat uterine and peritoneal cells: a cell culture model for endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 1220-1229.
440. **Quereda F, Barroso J, Acién P.** Endometriosis inducida en la rata Wistar: Avances en la caracterización del modelo experimental. *Prog Obst Gin* 1995; 38: 111-117.
441. **Hahn DW, Carrager RP, Foldesy RG, McGuire JL.** Development of an animal model for quantitatively evaluating effects of drugs on endometriosis. *Fertil Steril* 1985; 44: 410-415.
442. **Rock JA, Bobbie D, Parmley TH, Dubin NH.** Intraocular endometrium in the rabbit as a model for endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 81.
443. **Palatinsky A.** Zur dynamik der morfologischen veramderungen in ovarien der meerschweichen unter dem einfluss des implantierten endometriums. *Zentralbl Gynakol* 1986; 108: 560-569.
444. **Kida H.** Histological analysis of spontaneous adenomyosis-like changes in recombinant imbred mouse uterus (SMXA mouse) a novel animal model for adenomyosis. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1994; 46: 323-330.
445. **Cummings AM, Metcalf JL.** Induction of endometriosis in mice: A new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol* 1995; 9: 233-238.

446. **Lizuka A, Nakabachi A, Mori T, Park MK, Fujii Y, Nagasawa H.** Changes in citrate concentrations in the mouse uterus with experimentally induced adenomyosis. *Life Sci* 1996; 58: 397-403.
447. **Canis M, Bassil S, Bruhat MA.** Experimental endometriosis in monkeys. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 16.
448. **D'Hoodge TM, Bambra CS, De Jonge I, Machai PN, Korir R, Koninckx PR.** A serial section study of visually normal posterior pelvic peritoneum from baboons (*Papio cynocephalus*, *papio anubis*) with and without spontaneous minimal endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 63: 1322-1325.
449. **D'Hoodge TM, Bambra CS, Kazungu J, Koninckx PR.** Peritoneal fluid volume and steroid hormone concentrations in baboons with and without either spontaneous minimal/middle endometriosis or the luteinized unruptured follicle syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 1995; 256: 17-22.
450. **Rajkumar K, Schott P, Simpson CW.** The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. *Fertil Steril* 1990; 53: 921-925.
451. **Mann DR, Collins DC, Smith MM, Kessler MJ, Gould KG.** Treatment of endometriosis in monkeys: effectiveness of continuous infusion of a gonadotropin-releasing hormone agonist compared to treatment with a progestational steroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:1277-1283.
452. **Schleicher RL, Mann DR, Gould KG, Collins DC.** Serum levels of cholesterol and lipoproteins in rhesus monkeys: comparison of the effect of GnRH agonist and the progestin, levonorgestrel. *Fertil Steril* 1987; 47: 710-713.

453. **Okada H, Heya T, Ogawa Y, Shimamoto T.** One-month release injectable microcapsules of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Leuprolide acetate) for treating experimental endometriosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244: 744-750.
454. **Sakura Y, Masaki T, Sudo K, Nomura M, Shino A.** Histological studies on the therapeutic effect of sustained-release microsfera of a potent LHRH agonist (Leuprorelin acetate) in an experimental model in rats. *Endocrin Jap* 1990; 37: 719-729.
455. **Zanagnolo VL, Beck RB, Schlaff WD, Damewood MD, Bobbie D, Rock JA.** Time-related effects of gonadotropin-releasing hormone analog treatment in experimentally induced endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1991; 55: 411-415.
456. **Sudo K, Shiota K, Masaki T, Fujita T.** Effects of TAP-144-SR, a sustained-release formulation of a potent GnRH agonist, on experimental endometriosis in the rat. *Endocrin Jap* 1991; 38: 39-45.
457. **Tamaya T, Wada K, Imai A, Mori H, Ban H.** Rationale for frequency and dose of administration in gestrinone therapy for pelvic endometriosis in the experimental model of rabbit uterus. *Gen Pharmac* 1991; 22: 505-510.
458. **Yamashita S, Ohno Y, Kitagawa I, Hosoda S, Koishi K, Okada H.** Antiestrogenic effects of Danazol on rabbit uterus. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 77.*
459. **Sakamoto S, Tajima M, Sawaki K, Suzuki S, Kudo H, Sassa S, Kuwa K, Sugiura I, Kasahara N, Nagasawa H.** Effects of luteinizing hormone releasing hormone analogue on DNA synthesis in rat prostate and uterus. *In Vivo* 1993; 7: 13-16.

460. **Wright JA, Sharpe Timms KL.** GnRH agonist therapy reduces postoperative adhesion formation and reformation after adhesiolysis in rats models for adhesion formation and endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 63: 1094-1100.
461. **Mizutani T, Sakata M, Terakawa N.** Effect of gonadotropin releasing hormone agonist, nafarelin, buserelin and leuprolide, on experimentally induced endometriosis in the rat. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995; 40: 106-111.
462. **Kadaba R, Simpson W.** Disparate effect of tamoxifen in rats with experimetically induced endometriosis. *Endocrinology* 1990; 126: 3263-3267.
463. **Goulding A, Gold E, Feng W.** Tamoxifen in the rats prevents estrogen-deficiency bone loss elicited with the LHRH agonist, Buserelin. *Bon Miner* 1992; 18: 143-152.
464. **Xu LF, Wang M, Zhao CL.** Clinical effects and experimental study on Gossypol in endometriosis. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* 1989; 9: 462-464.
465. **Covens AL, Christopher P, Casper RF.** The effect of dietary supplementation with fish oil fatty acids on surgically induced endometriosis in the rabbit. *Fertil Steril* 1988; 49: 698-703.
466. **Manyak MJ, Nelson ML, Solomon D, Russo A, Thomas GF, Stillman RJ.** Photodynamic therapy of rabbit endometrial trasplants: A model for treatment of endometriosis. *Fertil Steril* 1989; 52: 140-145.
467. **Sakata M, Terakawa N, Mizutani T, Tanizawa O, Matsumoto K, Terada N, Sudo K.** Effects of Danazol, GnRH agonist and combination of Danazol and GnRH agonist on experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1679-1684.

468. **Sharpe KL, Bertero MC, Vernon MW.** Rapid regression of endometriosis by a new gonadotropin-releasing hormone antagonist in rats with surgically induced disease. *Current Concepts in Endometriosis*. Alan R. Liss Inc. 1990. 449-458.

469. **Sharpe KL, Bertero MC, Lyon BP, Muse KN, Vernon MW.** Follicular atresia and infertility in rats treated with an gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Endocrinology* 1990; 127: 25-31.

470. **Stöckermann K, Chwalisz K.** Effects of the progesterone antagonist Onapristone (ONA) on surgically endometriosis in rat. *Tercer Congreso Mundial de Endometriosis*. Bruselas 1992. Abstract 20.

471. **Tjaden B, Galetto D, Woodruff JD, Rock JA.** Time related effects of RU486 treatment in experimentally induced endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1993; 59: 437-440.

472. **Schenken RS, Asch RH.** Surgical induction of endometriosis in the rabbit: Effects on fertility and concentrations of peritoneal fluids prostaglandins. *Fertil Steril* 1980; 34: 581-587.

473. **Dargenio R, Golan A, Winston RM.** Experimental endometriosis and fertility: compared effects of an antigonadotropin (danazol) and an antiprostaglandin (indomethacin). *Acta Eur Fertil* 1984; 15: 257-259.

474. **Schenken RS, Asch RH, Williams RF, Hodgen GD.** Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: Luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions, and spontaneous abortions. *Fertil Steril* 1984; 41: 122-130.

475. **Hahn DW, Carrager RP, Foldesy RG, McGuire JL.** Experimental evidence for failure to implant as a mechanism of infertility associated with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1109-1113.

476. **Donnez J, Wayembergh M, Casanas-Roux F, Karaman Y, Willens T, Ferin J.** Effect on ovulation of surgically induced endometriosis in rabbits. *Gynecol Obstet Inves* 1987; 24: 131-137.
477. **Donnez J, Wayemberg M, Casanas-Roux F, Karaman Y, Nisolle M, Willens T.** Syndrome du follicule luteinise non rompu et endometriose experimentale chez la lapine. *J Gynecol Obstet Biol Reprod Paris* 1987; 16: 871-876.
478. **Kaplan CR, Eddy AE, Olive DL, Schenken RS.** Effect of ovarian endometriosis on ovulation in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 40-44.
479. **Dunselman GA, Willebrand D, Land SA, Bouckaert PX, Evers JL.** A rabbit model of endometriosis. *Gynecol Obstet Inves* 1989; 27: 29-33.
480. **Formelli G, Santandrea V, Demaria F, Sani G.** Effetti dell'endometriosi ovarica e peritoneale sulla fertilita. Studio sperimentale. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990; 66: 129-134.
481. **Johnson JV, Pozek MM, Moreno AC, Olive DL, Schenken RS.** Surgically induced endometriosis does not alter peritoneal factors in the rabbit model. *Fertil Steril* 1991; 56: 343-348.
482. **Moon CE, Bertero MC, Curry TE, London SN, Muse KN, Sharpe KL, Vernon MW.** The presence of luteinized unruptured follicle syndrome and altered folliculogenesis in rats with surgically induced endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 676-682.
483. **Dunselman GA, Dumoulin JC, Land JA, Evers JLH.** Lack of effect of peritoneal endometriosis on fertility in the rabbit model. *Fertil Steril* 1991; 56: 340-342.

484. **Dunselman GA.** Non primate experimental animal models in endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 15.

485. **Golan A, Dargenio R, Winston RM.** The effect of treatment on experimentally produced endometrial peritoneal implants. *Fertil Steril* 1986; 46: 954-958.

486. **Dargenio R, Corbucci MG, Lamanna MA, Garcea N.** Indomethacin and fertility in experimental endometriosis. *Acta Eur Fertil* 1992; 23: 85-88.

487. **Steinleitner A, Lambert H, Suarez M, Serpa N, Roy S.** Immunomodulation in the treatment of endometriosis-associated subfertility: use of pentoxifillyne to reverse the inhibition of fertilization by surgically induce endometriosis in a rodent model. *Fertil Steril* 1991; 56: 975-979.

488. **Steinleitner A, Lambert H, Suarez M, Serpa N, Robin B, Cantor B.** Perioovulatory calcium channel blockade enhances reproductive performance in an animal model for endometriosis-associated subfertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 949-952.

489. **Golan A, Dargenio R, Winston RM.** Fulguration versus resection of experimental endometrial peritoneal implants in the rat. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1984; 24: 286-288.

490. **Keye W Jr, Matson GA, Dixon J.** The use of the Argon Laser in the treatment of experimental endometriosis. *Fertil Steril* 1983; 39: 26-29.

491. **Chaubard T, Mage G, Richard E, Pouly JL, Bruhat MA.** Utilisation du laser CO2 dans le traitement de l'endometriose. Experimentation chez la lapine. *J Gynecol Obstet Biol Reprod Paris* 1984; 13: 861-866.

492. **Portz DM, Elkins TE, White R, Warren J, Adadevoh S, Randollph J.** Oxygen free radicals and pelvic adhesions formation: I. Blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriosis model. *Int J Fertil* 1991; 36: 39-42.
493. **Sternfeld MD, West NB, Brenner RM.** Immunocytochemistry of the estrogen receptor in spontaneous endometriosis in rhesus macaques. *Fertil Steril* 1988; 49: 342-348.
494. **Sharpe KL, Bertero MC, Vernon MW.** Detection of a progesterone-induced secretory proteins synthesized by the uteri but not the endometriotic implants of rats with induced endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 55: 403-410.
495. **Coppens M, Dhont M, Serreyn R, De Boever J, De Craene A, Thaler B, Vandekerckhove D, Roels H.** Estrogen and progesterone receptor distribution in eutopic and ectopic endometrial tissue. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 59.
496. **Ortega Moreno J.** Receptor concentrations for estradiol and progesterone in surgically induced endometriosis in the rat. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1994; 54: 123-126.
497. **Steinleitner A, Lambert H, Kazensky C, Danks P.** Peritoneal fluid from endometriosis patients affects reproductive in an in vivo model. *Fertil Steril* 1990; 53: 926-929.
498. **Kennedy SH, Cederholm-Williams SA, Barlow DH.** The effect of injecting "Chocolate" fluid from endometriotic cysts into the peritoneal cavity of mice. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 75.

499. **D'Hoodge TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, De Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR.** Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*). *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 125-134.
500. **Brogniez AP, Mordon SR, Devoiselle JM, Farre I, Querleu D, Brunetaud JM.** Fluorescence of experimental endometriosis in rabbits using tamoxifen-eosin association. *Hum Reprod* 1995; 10: 927-931.
501. **Berquist A, Jeppsson S, Kullander S, Ljungberg O.** Human endometrium trasplantated into the nude mice. Histologic effects of various steroid hormones. *J Pathol* 1985; 119: 336-334.
502. **Berquist A, Jeppsson S, Kullander S, Ljungberg O.** Human uterine endometrium and endometriotic tissue trasplantated into the nude mice. Morphologic effects of various steroid hormones. *Am J Pathol* 1985; 121: 337-341.
503. **Brotos J, Ruiz JA, Acién P.** Endometriosis inducida en ratas Wistar. Elección del modelo experimental. *RIF* 1992; 9: 27-31.
504. **Barragán JC, Brotos J, Ruiz JA, Acién P.** Experimentally induced endometriosis in rats: effect on fertility and the effects of pregnancy and lactation on the ectopic endometrial tissue. *Fertil Steril* 1992; 58: 1215-1219.
505. **Schenken RS, Willians RF, Hodgen GD.** Effect of pregnancy on surgically induced endometriosis cynomolgus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1392-1396.
506. **Cummings AM, Metcalf JL.** Effect of surgically induced endometriosis on pregnancy and effect of pregnancy and lactation on endometriosis in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 212: 332-337.

507. **Burke DC.** The interferons. *Br Med Bull* 1985; 41: 333-338.
508. **Isaacs A, Lindenmann J.** Virus interference I. The interferon. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1957; 147: 258-267.
509. **Tyrrell DAJ.** Interferon produced by cultures of calf kidney cells. *Nature* 1959; 184: 452-453.
510. **Gresser I, Bourali C, Levy JP, Fontaine-Brouty-Boye D, Thomas MT.** Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations. *Proc Natl Acad Sci* 1969; 63: 51-57.
511. **Strander H, Einhorn S.** Effect of human leucocyte interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture. *Int J Cancer* 1977; 19: 468-473.
512. **Kingsman SM, Kingsman AJ.** The production of interferon in bacteria and yeast. En Burke DC, Morris AG (Eds). *Interferons: from molecular biology to clinical applications.* Cambridge University Press. Londres 1983. 211-254.
513. **Borden EC, Ball LA.** Interferons: Biochemical, cell growth inhibitory, and immunological effects. *Prog Hematol* 1981; 12: 299-339.
514. **Ledesma F, Echevarría S, De la Peña J, Crespo J.** Tipos, mecanismos de acción y efectos fundamentales del Interferón. *Gastrum* 1991; 63: 39-51.
515. **Baron S, Dianzani F, Stanton J.** General considerations of the interferon system. *Texas Rep Biol Med* 1981; 41: 1-12.
516. **Toy JL.** The Interferons. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 1-13.

517. **Friedman RM.** Interferons. En Oppenheim JJ, Shevach EM (Eds). Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation. Oxford University Press. New York 1990. 194-209.
518. **Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel ES.** Interferons and their actions. Ann Rev Biochem 1987; 56: 727-777.
519. **Zoon KC.** Human interferons: Structure and function. Interferon 1988; 9: 1-11.
520. **Branca A, Baglioni C.** Evidence that types I and II interferons have different receptors. Nature 1981; 294: 768-770.
521. **Peters M.** Mechanism of action of interferon. Sem Liv Dis 1989; 9: 235-239.
522. **Stewart II WE.** The interferon system. (2nd ed). Springer-Verlag. New York 1981. 257-261.
523. **Cantell K.** Why is interferon in clinical use today?. En Gresser I (Ed). Interferon. Academic Press. New York 1979. 2-7.
524. **Nagabhushan TL, Surprenant H, Le HV.** Characterization of genetically engineered alpha-2 interferon. En Zoon KC, Noguchi PD, Liu TY (Eds). Interferon Research. Clinical application and regulatory consideration. Elsevier. New York 1984. 27-41.
525. **Whitaker-Dowling P, Youngner JS.** Antiviral effects of interferon in different virus-host cell systems. En Pfeffer LM (Ed). Mechanism of Interferon Actions. CRC Press. Boca Raton (Florida) 1987. 83-98.

526. **Alvarez-Mon M, Isasi C, Vaquer S, Manzano L, Rodríguez Zapata M, Carballido J.** El interferón. Aspectos básicos de su efecto modulador sobre el sistema inmune. *Inflamación* 1990; 93: 107-110.
527. **Sica G, Natoli V, Stella C, Del Bianco S.** Effect of natural beta interferon on cell proliferation and steroid receptor level in human breast cancer cells. *Cancer* 1987; 60: 2419-2423.
528. **Donini S, Iacopino F, Angelucci C, Lama G, Bartoleschi C, Serlupi O, Robustelli dela Cuna G, Fattorossi A, Sica G.** Effect of natural beta interferon on estrogen receptor mRNA and cell cycle kinetics of CG5 cells. *J Interferon Res* 1991 ; 11: 231.
529. **Clemens M.** Interferon and oncogenes. *Nature* 1985; 313: 531-532.
530. **Schultz RM, Ppapametheakis JD, Chiringos MA.** Interferon: An inducer of macrophage activation by polyanions. *Science* 1977; 197: 674-676.
531. **Biliau A.** The interferon-interleukine 1 connection. *Interferon* 1987; 9: 91-111.
532. **Biliau A, De somer P, Edy VG, De Clerk E, Heremans H.** Human fibroblast interferon for clinical trials: Pharmacokinetics and tolerability in experimental animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 56-63.
533. **Biliau A, Heremans H, Ververken D, Van Damme J, Carton H, De somer P.** Tissue distribution of human interferons after exogenous administration in rabbits monkeys, and mice. *Arch Virol* 1981; 68: 19-25.
534. **Bocci V.** Pharmacokinetics of interferons and practical implications. En Revel M (Ed). *Clinical aspects of interferons.* Kluwer Academic Publisher. Boston 1988. 259-269.

535. **Bocci V, Pessina GP, Paulesu L, Muscettola M, Valeri A.** The lymphatic route. Distribution of human natural interferon-B in rabbit plasma and lymph. *J Interferon Res* 1988; 8: 633-640.
536. **Bocci V, Pacini A, Muscettola M, Pessina GP, Paulesu L, Bandinelli L.** The kidney is the main site of interferon catabolism. *J Interferon Res* 1982; 2: 309-314.
537. **Wills RJ.** Clinical Pharmacokinetics of interferons. *Clin Pharmacokinet* 1990; 19: 390-399.
538. **Biliau A.** The clinical application of fibroblast interferon. An Overview. *Med Oncol & Tumor Pharmacother* 1984; 1: 87-96.
539. **Camps J.** Hepatitis crónica e interferon. *Clínica rural* 1995; 449: 4-10.
540. **Spiegel RJ.** Interferon alpha-2b: clinical overview. *Cancer Treatment Reviews* 1985; 12: 5-16.
541. **Brotons J.** Endometriosis inducida en ratas Wistar. Elección del modelo experimental. Estudio histopatológico y efectos de la castración. En: Memoria de Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Alicante, 1991.
542. **Hernández Vaquero D.** El artículo científico en biomedicina. Normas para la publicación de trabajos. CIBA-GEIGY S.A.. Barcelona 1993. 13-18.
543. **Calnam J, Barabas J.** Cómo escribir en medicina. Ed. Daimon. Barcelona 1984.
544. **Laporte JR.** Principios básicos de investigación clínica. ZENECA FARMA. Madrid 1993.

545. **Streuli M, Shigekazu N, Weissman C.** At least three human type alpha interferons: structure of alpha 2. *Science* 1980; 209: 1343-1347.
546. **Katafuchi T, Hori T, Take S.** Central administration of interferon alpha enhances rat sympathetic nerve activity to the spleen. *Neurosci Lett* 1991; 125: 37-40.
547. **Janicki PK.** Binding of human alpha-interferon in the brain tissue membranes of the rat. *Res Commun Chem Phatol Pharmacol* 1992; 75: 117-120.
548. **Mencies RA, Patel R, Hall NRS, O'Grady MP, Rier SE.** Human recombinant interferon alpha inhibits naloxone binding to rat brain membranes. *Life Sci* 1992; 50: 227-231.
549. **Saphier D, Welch JE, Chuluyan HE.** Alpha-interferon inhibits adrenocortical secretion via nu-1-opioid receptors in the rat. *Eur J Pharmacol* 1993; 236: 183-191.
550. **Carter WA.** Minireview. Glycosylation, intraespecies molecular heterogeneity and transpecies activity of mammalian interferons. *Life Sci* 1979; 25: 717-728.
551. **Houglum JE.** Interferon: Mechanism of action and clinical value. *Clin Pharm* 1983; 2: 20-28.
552. **Bocci V.** What is the role of carbohydrates in interferons?. *Biochemical Sciences* 1983; 8: 432-434.
553. **Borden EC, Murphy FA.** The interferon refractory state: In vivo and in vitro studies of its mechanism. *J Immunol* 1971; 106: 134-142.
554. **Drasner K, Epstein CJ, Epstein LB.** The antiproliferative effects of interferon on murine embrionic cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 160: 46-49.

555. **Van Moorselar RJA, Hendricks BT, Borm G, Van der Meide PH, Debruyne FMJ, Schalken JA.** Inhibition of rat bladder tumor (RBT323) growth by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vivo. *J Urol* 1992; 148: 458-462.

556. **Borden EC, Hogan TF, Voelkel JG.** Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons alpha and beta for diploid and transformed human cells. *Cancer Research* 1982; 42: 4948-4953.

557. **Asano M, Hayashi M, Yoshida E, Kawade Y, Iwakura Y.** Induction of interferon alpha by interferon beta, but not of interferon beta by interferon alpha, in the mouse. *Virology* 1990; 176: 30-38.

558. **Taylor-Papadimitriou J, Kiriakides DA, Shearer M, Kortsaris A, Rozengurt E.** Multiple biologic effects of interferon. In *The biology of the interferon system*. De Maeyer E, Schellekens H. (Eds.). Elsevier Science Publishers B.V.. 1983. 267-279.

559. **Baron S, Stanton GJ, Fleischmann Jr WR, Dianzani F.** General considerations of the interferon system. In: Baron S, Dianzani F, Fleischmann WR (Eds.) *The interferon system: A review to 1987*. University of Texas Press. Austin 1987. 1-17.

560. **Homm RJ, Garza DE, Mathur S, Austin M, Baggett B, Williamson HO.** Immunological aspects of surgically induced experimental endometriosis: Variation in response to therapy. *Fertil Steril* 1989; 52: 132-139.

561. **Sims JS, Chegini N, Williams RS, Rossi AM, Dunn WA Jr.** Identification of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor in surgically induced endometriosis in rats. *Obstet Gynecol* 1991; 78: 850-857.

562. **Selva Otaolaurruchi J, Sastre Lorca JJ.** Manual de suturas. Laboratorios Lorca Marín S.A.. Murcia 1987.
563. **Igawa T, Maitani Y, Machida Y, Nagai T.** Intranasal administration of human fibroblast interferon in mice, rats, rabbits and dogs. Chem Pharm Bull Tokyo 1990; 38: 549-551.
564. **Zbinden G.** Effects of recombinant human alpha-interferon in a rodent cardiotoxicity model. Toxicol Lett 1990; 50: 25-35.
565. **Cantell K, Pyhälä L.** Pharmacokinetics of human leucocyte interferon. J Infect Dis 1976; 133: 6-12.
566. **Spiegel RJ, Spicehandler JR, Jacobs SL, Oden EM.** Low incidence of serum neutralizing factors in patients receiving recombinant alpha-2b-interferon (Intron A^R). Am J Med 1986; 80: 223-228.
567. **Barragán JC.** Influencia de la endometriosis experimental sobre la fertilidad en ratas wistar, y de los estados de embarazo y lactancia sobre la enfermedad. En: Memoria de Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Alicante, 1991.
568. **Wild RA, Medders D, Zhang RJ.** F(ab')₂ segment is the active component of immunoglobulins autoantibody generation in patients with endometriosis. Fertil Steril 1991; 56: 900-903.
569. **Gleicher N.** The role of humoral immunity in endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand 1994; 159: 15-17.
570. **Gleicher N.** Immune dysfunction. A potential target for treatment in endometriosis. Br J Obstet Gynaecol 1995; 102: 4-7.

571. **Lachapelle MH, Hemmings R, Roy DC, Falcone T, Miron P.** Flow cytometric evaluation of leucocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients. *Fertil Steril* 1996; 65: 1135-1140.
572. **Garza D, Mathur S, Dowd MM, Smith LF, Williamson HO.** Antigenic differences between the endometrium of women with and without endometriosis. *J Reprod Med* 1991; 36: 177-182.
573. **Kilpatrick DC, Haining RE, Smith SS.** Are cardiolipin antibody levels elevated in endometriosis?. *Fertil Steril* 1991; 55: 436-437.
574. **Moen M, Bratlie A, Moen T.** Distribution of HLA-antigens among patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 123: 25-27.
575. **Maxwell C, Kilpatrick DC, Haining R, Smith SK.** No HLA-DR specificity is associated with endometriosis. *Tissue Antigens* 1989; 34: 145-147.
576. **Dmowski WP, Gebel HM, Rawlins RG.** Immunologic aspects of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989; 16: 93-103.
577. **Haney AF.** Alterations in cell mediated immunity in women with endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 53.
578. **Evers JLH.** The immune system in endometriosis: Introduction. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 51.
579. **Nava G, Hernández C, Pérez M, Mojarra JM, Gonzalez ME, Bustos H, Alvarado A, Vadillo F.** Respuesta inmune peritoneal en endometriosis. *Ginecol Obstet Mex* 1996; 64: 147-153.

580. **Olive DL, Montoya I, Riehl RM, Schencken RS.** Macrophage-conditioned media enhanced endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 953-958.
581. **Balasz J.** Aspectos inmunológicos de la endometriosis. *Prog Obst Gin* 1993; 36: 122-135.
582. **Steinleitner A, Lambert H, Lauredo I.** Heterologous trasplantation of activated murine peritoneal macrophages inhibits gamete interaction in vivo: a paradigm for endometriosis-associated subfertility. *Fertil Steril* 1990; 54: 725-729.
583. **Steinleitner A, Lambert H.** Immunomodulation in the treatment of endometriosis associated subfertility. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 55.
584. **Snyder DS, Unanue ER.** Corticosteroids inhibit murine macrophge Ia expression and Interleukin-1 production. *J Immunol* 1982; 129: 1803-1805.
585. **Simón C, Gomez E, Mir A, De los Santos MJ, Pellicer A.** Glucocorticoid treatment decrease sera embriotoxicity in endometriosis patiens. *Fertil Steril* 1992; 58: 284-289.
586. **Steinleitner A, Lambert H, Roy S.** Immunomodulation with pentoxifylline abrogates macrophage-mediated infertility in an in vivo model: a paradigm for a novel approach to the treatment of endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 1991; 55: 26-31.
587. **Nothnick WB, Curry TE, Vernon MW.** Immunomodulation of rat endometriotic implant growth and protein production. *Am J Reprod Immunol* 1994; 31: 151-162.

588. **Sawatari Y, Horii T, Hoshiai H, Noda K.** Oily contrast medium as therapeutic agent for sterility due to mild endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 55.
589. **Hill Ja, Barbieri RL, Anderson DJ.** Immunosuppressive effects of danazol in vitro. *Fertil Steril* 1987; 48: 414-418.
590. **Vigano P, Di Blasio AM, Busacca M, Gofiantini C, Candiani M, Vignali M.** Danazol suppresses both spontaneous and activated human lymphocyte-mediated cytotoxicity. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 88.
591. **Vigano P, Di Blasio AM, Busacca M, Vignali M.** Immunosuppressive effect of danazol on lymphocyte mediated cytotoxicity toward human endometrium stromal cells. *Gynecol Endocrinol* 1994; 8: 13-19.
592. **Vigano P, Magri B, Di Blasio AM, Busacca M, Vignali M.** Gestrinona inhibits macrophage function and mitogen stimulated lymphocyte proliferation in vitro. *J Reprod Immunol* 1994; 27: 63-71.
593. **El-Roey A, Dmowski WP, Gleicher N, Radwanska E, Harlow L, Binor Z, Tummon I, Rawlins RG.** Danazol but not gonadotropin-releasing hormone agonist suppresses autoantibodies in endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 864-871.
594. **Dmowski WP, Gebel H, Braum D.** Manipulation of the immune system in the management of endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 54.
595. **Kennedy SH, Starkey PM, Sargent IL, Hicks BR, Barlow DH.** Antiendometrial antibodies in endometriosis measure by an enzyme-linked immunosorbent assay before and after treatment with Danazol and Nafarelin. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 914-918.

596. **Odukoya OA, Bansde A, Wilson AP, Weetman AP, Cooke ID.** Serum soluble CD23 in patients with endometriosis and the effect of treatment with Danazol and Leuprolide acetate depot injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 942-946.
597. **Garzetti GG, Cianavattini A, Provinciali M, Muzzioli M, Di Stefano G, Fabris N.** Natural cytotoxicity and GnRH agonist administration in advanced endometriosis: positive modulation on Natural Killer activity. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 234-240.
598. **D'Hoodghe TM, Bambra CS, Raemaekers BM, De Jonge I, Hill JA, Koninckx PR.** The effects of immunosuppression on development and progression of endometriosis in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril* 1995; 64: 172-178.
599. **Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I.** Decreased Natural Killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* 1994; 62: 1086-1088.
600. **Hirsch MS, Ellis DA, Black PH, Monaco AP, Wood ML.** Immunosuppressive effects of an interferon preparation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 234-236.
601. **De Maeyer E, Schellekens H.** The biology of the Interferon system. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam 1981.
602. **Kadish A, Tansey F, Yu G, Doyle A, Boom B.** Interferon as a mediator of human lymphocyte suppression. *J Exp Med* 1980; 151: 637-650.
603. **Dianzani F, Baron S.** Unexpectedly rapid action of human interferon in physiological conditions. *Nature* 1975; 257: 682-684.
604. **Spiegel RJ.** Clinical overview of alpha interferon. Studies and future directions. *Cancer* 1987; 59: 626-631.

605. **Ohtsuka N.** Study of pathogenesis of adhesions in endometriosis. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1980; 32: 1758-1763.
606. **Surrey ES, Halme J.** Endometriosis as a cause of infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989; 16: 79-91.
607. **Lacopino F, Ferrandina G, Scambia G.** Modulation of EGF-receptor expression by natural B-interferon in CG-5 human breast cancer cell line. The 1991 ISIR meeting on the Interferon system. Nov-1991. *J Interferon Res* 1991; 11: 230 (Abstract).
608. **Zoon K, Zur Neidden D, Hu R, Karasaki Y, Komoriya A, Arnheiter H.** Interferon and modulation of epidermal growth factor receptor activities. In Dianzani F, Rossi GB (Eds.). *The Interferon system*. Raven Press. New York 1985. 363-366.
609. **Nanes MS, McKoy WM, Marx JJ.** Inhibitory effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (Ros 17/2-8). *Endocrinology* 1989; 124: 339-345.
610. **Horisberger MA, Hochkeppel HK.** INF-alpha induced human 78 KD protein: Purification and homologies with the mouse MX protein, production of monoclonal antibodies and potentiation effect of INF gamma. *J Interferon Res* 1987; 7: 331-343.
611. **Malangoni MA, Livingston DH, Sonnenfeld G, Polk HC Jr.** Interferon alpha and tumor necrosis factor alpha. Use in gram negative infection after shock. *Arch Surg* 1990; 125: 444-446.

612. **Berek JS, Hacker NF, Lichtenstein A, Jung T, Spina C, Knox RM, Brady J, Greene T, Ettinger LM, Lagasse LD, et al.** Intraperitoneal recombinant alpha interferon for "salvage" immunotherapy in stage II epithelial ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer Res* 1985; 45: 4447-4453.
613. **Rossi GB.** Interferons and cell differentiation. *Interferon* 1985; 6: 31-68.
614. **Balkwill FR.** Interferons. *Lancet* 1989; 1: 1060-1066.
615. **Von Wussow P, Borden EC.** Antibodies to interferons in patients: defining their significance. *J Interferon Res* 1989; 9: (Suppl 1) (Special Issue).
616. **Shoham J, Revel M.** Interferon therapy of Herpes Simplex dermal infections and Papilomavirus condylomata. In: Revel M (Ed.). *Clinical aspects of interferons*. Kluwer Academic publisher. Boston 1988. 17-38.
617. **Niimura M.** Application of interferon beta in virus induced papillomas. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 1495-1515.
618. **Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Rao PN.** Antiproliferative effect of interferon-r in human endometrial epithelial cells in vitro: potential local growth modulatory role in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 131-138.
619. **Braum DP, Muriana A, Gebel D, Rotsztejn D, Rana N, Rotman C, Dmowski WP.** Proliferation of endometrial cells in response to macrophage derived factors in patients with endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 89.
620. **Hornstein MD, Yeh J.** Gene expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and their common receptor in cultured human endometrial cells. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 74.

621. **Suginami H, Nakahashi N, Kitagawa H, Takeda Y.** Lectin-precipitable peritoneal fluid glycoproteins in women with and without endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 54.

622. **Sharpe KL, Vernon MW.** Polypeptides synthesized and released by rat ectopic uterine implants differ from those of the uterus in culture. *Biol reprod* 1993; 48: 1334-1340.

623. **Whitworth CM, Mulholland J, Dunn RC, Glasser SR.** Growth factor effects on endometrial epithelial cell differentiation and protein synthesis in vitro. *Fertil Steril* 1994; 61: 91-96.

624. **Epstein LB.** The immunoregulatory importance of interferons in vivo. *Ann Inst Pasteur/Immunol* 1985; 136: 68-73.

625. **Murray HW, Rubin BY, Carriero S, Acosta AM.** Reversible defect in antigen-induced lymphokine and gamma interferon generation in cutaneous Leishmaniasis. *J Immunol* 1984; 133: 2250-2254.

626. **Schlick E, Hartung K, Chiringos MA.** Role of prostaglandin E and interferon in secretion of colony-stimulating factor by murine macrophages after in vitro treatment with biological response modifiers. *Int J Immunopharm* 1984; 6: 407-418.

627. **Hanabayashi T, Misao R, Sawairi M, Itoh N, Wada K, Mori H, Tamaya T.** Peritoneal fluid interleukin-1 receptor antagonist in patients with endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 32.

628. **Itoh N, Misao R, Swairi M, Hanabayashi T, Wada K, Mori H, Tamaya T.** Analysis of cytokine gene expression in peritoneal mononuclear cells using the reverse transcription Polimerase chain reaction. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 30.

629. **Heron I, Berg K, Cantell K.** Regulatory effect of interferons on T cells in vitro. *J Immunol* 1976; 117: 1370-1373.
630. **Knop J, Stremmer R, Taborski U, Freitag W, De Maeyer-Guinard J, Macher E.** Inhibition of the T suppressor circuit of delayed-type hypersensitivity by interferon. *J Immunol* 1984; 133: 2412-2416.
631. **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M.** Flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of women with endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Poster 7.
632. **Marcheti B, Gallo F, Giuffrida G, Morale MC, Mattina M, Romeo C, Maiolino C, Farinella Z, Palumbo G.** Peripheral and local immune compartments in endometriosis: Effect of LHRH agonist (D-TRYP-LHRH) treatment. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 90.
633. **Matsubayashi H, Makino T, Iwasaki K, Maruyama T, Ozawa N, Hosokawa T, Someya K, Nozawa S.** Leucocyte subpopulation changes in rat with autotransplanted endometrium and the effect of Danazol. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33: 301-314.
634. **Braun W, Levy HB.** Interferon preparations as modifiers as immune responses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 141: 769-773.
635. **Rasmussen L, Merigan TC.** Effect of interferon therapy on circulating lymphocytes in humans. *J Interferon Res* 1980; 1: 101-105.
636. **Isaacson KB, Galman MG, Cuotifarís C, Lyttle CR.** Endometrial synthesis and secretion of complement component-3 by patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 1990; 53: 836-841.

637. **Dmowski WP, Rana N, Michalowska J, Friberg J, Papierniak C, El Roeiy A.** The effect of endometriosis, its stage and activity, and of antibodies on in vitro fertilization and embryo transfer success rates. *Fertil Steril* 1995; 63: 555-562.
638. **Isaacson KB, Xu Q, Lyttle CR.** The effect of estradiol on the production and secretion of complement component 3 by the rat uterus and surgically induced endometriotic tissue. *Fertil Steril* 1991; 55: 395-402.
639. **Timonen T, Ortaldo J, Herberman R.** Analysis by a single cell cytotoxicity assay of NK frequencies among LGL and of the effects of INF their activity. *J Immunol* 1981; 126: 2321-2327.
640. **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR.** The natural killer activity of peritoneal fluid mononuclear cells is decreased in women with endometriosis. Tercer Congreso Mundial de Endometriosis. Bruselas 1992. Abstract 84.
641. **Oosterlynck DJ, Lacquet FA, Waer M, Koninckx PR.** Lymphokine activated killer activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Inves* 1994; 37: 185-190.
642. **Witz CA, Montoya IA, Dey TD, Schenken RS.** Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32: 173-179.
643. **Waller KG, Shaw RW.** GnRH analogues for the treatment of endometriosis: Long term follow-up. *Fertil Steril* 1993; 59: 511-515.
644. **Sicca G, Lacopino F, Lama G, Dell'Acqua S, De Cicco F, Mariani L, Latorre P, Villani C, Atlante G, Marchetti P, Carenza L.** Effect of natural beta interferon on estrogen and progesterone receptors in patients affected by primary endometrial cancer. *J Interferon Res* 1991; 11: 119-120.