

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y  
GINECOLOGÍA

EXPRESIÓN TISULAR DE LOS COMPONENTES DEL  
SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS  
METALOPROTEASAS EN LA ENDOMETRIOSIS

JUAN GILABERT ESTELLÉS

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 31 d' Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. Juan José Parrilla Paricio
- D. Antonio Cano
- D. Enrique Alburch
- D. Vicente Vicente García
- D. Ramón Miralles

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. A. Estellés

D. J. Gilabert

D. A. Romeu

©Copyright: Servei de Publicacions  
Juan Gilabert Estellés

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6140-7

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE  
PEDIATRIA, OBSTETRICIA I GINECOLOGIA

**EXPRESIÓN TISULAR DE LOS COMPONENTES  
DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS  
METALOPROTEASAS EN LA ENDOMETRIOSIS**

Memoria presentada por  
Don Juan Gilabert Estellés  
para optar al grado de Doctor  
en Medicina y Cirugía.  
Valencia, 2003.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera transmitir a mi madre, la Dra. Amparo Estellés, y a mi padre, el Dr. Juan Gilabert, un profundo sentimiento de agradecimiento y cariño por haber sabido ser unos padres maravillosos, unos directores de tesis ejemplares y haberme contagiado su inquietud de superación y pasión por la medicina y la vida. Desde siempre he tenido el deseo de trabajar en equipo con los dos, y este proyecto me ha permitido ver cumplida esa ilusión.

Al Dr. Alberto Romeu, Jefe de Servicio de Reproducción del Hospital Universitario La Fe, como director de tesis, por su inestimable ayuda en el desarrollo de este proyecto, por su amistad y por transmitirme un sentimiento de superación en mi trabajo.

Al director de Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe, el Dr. Miguel Rivera, le agradezco sinceramente haberme permitido llevar a cabo mi trabajo en el citado Centro.

No quiero dejar de hacer constar mi aprecio al Dr. Francisco España, quien me ha prestado desinteresadamente su colaboración en cuantas ocasiones ha sido requerida. Sus conocimientos en el campo de la fibrinólisis, en general, y del papel del PAI-3 en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, en particular, han sido de inestimable ayuda.

Muy especialmente quiero agradecer al Dr. Justo Aznar, Jefe del Departamento de Biopatología Clínica, y al Dr. Edelmiro Réganon, Jefe de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación, su colaboración, su atención y su afecto. Ambos gozan de un reconocido prestigio en el campo de la hemostasia y sus aportaciones han significado un estímulo continuo para el desarrollo de este trabajo.

El resto del personal facultativo de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación, Dra. María Teresa Santos, Dra. Juana Vallés y Dra. Virtudes Vila, y en general todo el personal de la Unidad con su afecto incondicional han creado vínculos sinceros de amistad que han hecho más agradables los ratos de trabajo en

este proyecto. En especial quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dña. Pilar Escamilla y Dña. Araceli Serralbo, tanto por su participación en el desarrollo de las técnicas de laboratorio como por el cariño y simpatía demostrados en todos estos años.

A la Dra. Melitina Chirivella, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Fe, por su colaboración en la obtención y manipulación de muestras de tejido para microscopía, así como por su inestimable ayuda en el diagnóstico histológico de las mismas.

A los becarios Remedios Castelló y Luis Ramón por su desinteresada ayuda, especialmente en el desarrollo de las técnicas de hibridación in situ y de RT-PCR y por el entusiasmo demostrado en esta línea de investigación que hemos desarrollado juntos.

Al personal Facultativo del Servicio de Ginecología del Hospital Arnau de Vilanova y del Servicio de Reproducción del Hospital La Fe de Valencia, por su colaboración desinteresada en la obtención de muestras y por compartir la devoción por una especialidad tan apasionante como es la ginecología.

No puedo dejar de agradecer a mi familia, en especial a mi hermana María, a mis amigos y compañeros por el tiempo del que el trabajo nos priva y por su completo apoyo.

Finalmente, a mi mujer Esther, quien es la razón de mi vida, por su amor, amistad y dedicación incondicional. Por ser como es.

Este trabajo ha sido financiado en parte por las Ayudas de Investigación PI020136 y 99/1035 del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria).

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ag	Antigénico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
EEM	Error estándar de la media
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGF	<i>Epidermic growth factor</i>
ELISA	<i>Enzime-linked immunosorbent assay</i>
fc	Funcional
IL	Interleuquina
LBS	<i>Lysine binding sites</i>
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteasas de la MEC
MT-MMPs	MMPs tipo membrana
NK	<i>Natural Killer</i>
PAIs	Inhibidores de los activadores del plasminógeno
PBS	Tampón fosfato salino (0,01M, pH 7,4, NaCl 0,14M)
PCI/PAI-3	Inhibidor de la proteína C / Inhibidor del activador del plasminógeno tipo -3
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PET	Tampón PBS/EDTA/Tween 20
pNA	p-Nitroanilina
RNA	Ácido ribonucleico
cRNA	RNA complementario
mRNA	RNA mensajero
tRNA	RNA de transferencia
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>

TBS	Tampón tris salino
TGFβ	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TIMPs	Inhibidores tisulares de las MMPs
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
tPA	Activador tisular del plasminógeno
sct-PA	tPA de una cadena
tct-PA	tPA de dos cadenas
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
scu-PA	uPA de una cadena
tcu-PA	uPA de dos cadenas
HMW-uPA	uPA de alto peso molecular
LMW-uPA	uPA de bajo peso molecular
uPAR	Receptor de uPA
su-PAR	Forma soluble de uPAR
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
X	Media aritmética

*A mis padres, quienes me han  
enseñado cómo ser persona.*

*A mi yaya.*

*A mi inspiración diaria, Esther.*

# ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>52</b>
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>56</b>
<b>4.- RESULTADOS</b>	<b>87</b>
<b>5.- DISCUSIÓN</b>	<b>128</b>
<b>6.- CONCLUSIONES</b>	<b>138</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>141</b>

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <u>ASPECTOS GENERALES DE LA ENDOMETRIOSIS</u></b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.1. Teorías etiopatogénicas</b>	2
1.1.1.1. Teoría de la metaplasia	3
1.1.1.2. Teoría de la inducción	3
1.1.1.3. Teoría de la implantación	4
1.1.1.4. Mecanismos etiopatogénicos a nivel tisular	5
<b>1.1.2. Epidemiología</b>	8
<b>1.1.3. Aspectos clínicos</b>	9
<b>1.2. <u>ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA FIBRINOLÍTICO</u></b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.1. Aspectos generales de la fibrinólisis</b>	13
<b>1.2.2. Plasminógeno y plasmina</b>	15
<b>1.2.3. Activadores fibrinolíticos</b>	17
1.2.3.1. Activador tisular del plasminógeno (tPA)	17
1.2.3.2. Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)	18
<b>1.2.4. Inhibidores fibrinolíticos</b>	21
1.2.4.1. Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)	21
1.2.4.2. Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 (PAI-2)	23
1.2.4.3. Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3 (PAI-3 o inhibidor de la proteína C)	25
<b>1.2.5. Cambios fibrinolíticos en la endometriosis</b>	26
1.2.5.1. Tejido endometrial eutópico	26
1.2.5.2. Tejido endometriósico	28
1.2.5.3. Líquido peritoneal	30
<b>1.3. <u>ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA DE LAS METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MMPs)</u></b> .....	<b>33</b>

1. 3. 1. La matriz extracelular (MEC)	33
1. 3. 2. Las metaloproteasas matriciales (MMPs)	35
1. 3. 3. Inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs)	39
1. 3. 4. Papel de las MMPs en la menstruación	41
1. 3. 5. Regulación paracrina	44
1. 3. 6. Cambios en la endometriosis	46
1. 3. 6. 1. Líquido peritoneal	46
1. 3. 6. 2. Endometriosis y MMPs	48
<b><u>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b><u>3. MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b><u>56</u></b>
3. 1. <u>GRUPOS CLÍNICOS</u> .....	57
3. 1. 1. Mujeres sin endometriosis	57
3. 1. 2. Mujeres con endometriosis	60
3. 2. <u>MUESTRAS</u> .....	62
3. 2. 1. Endometrio control	62
3. 2. 2. Endometrio eutópico	62
3. 2. 3. Endometrio ectópico	62
3. 2. 4. Líquido peritoneal	63
3. 2. 5. Preparación y separación del tejido	63

<b>3. 3. <u>TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS, FUNCIONALES Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</u></b> .....	65
<b>3. 3. 1. Cuantificación de proteínas totales</b>	65
<b>3. 3. 2. Cuantificación antigénica y funcional de los componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas</b>	66
3. 3. 2 .1. Determinación antigénica de PAI-1	66
3. 3. 2 .2. Determinación funcional de PAI-1	69
3. 3. 2 .3. Determinación antigénica de tPA	71
3. 3. 2 .4. Determinación funcional de tPA	71
3. 3. 2 .5. Determinación antigénica de PAI-2	72
3. 3. 2 .6. Determinación antigénica de uPA	72
3. 3. 2 .7. Determinación funcional de uPA	72
3. 3. 2 .8. Determinación antigénica uPAR	73
3. 3. 2 .9. Determinación antigénica de PAI-3	74
3. 3. 2 .10. Determinación de los complejos uPA: PAI-3 y tPA: PAI-3	74
3. 3. 2 .11. Determinación antigénica de MMP-3	74
3. 3. 2 .12. Determinación antigénica de TIMP-1	74
<b>3. 4. <u>INMUNOHISTOQUIMIA</u></b> .....	75
<b>3. 5. <u>HIBRIDACIÓN IN SITU</u></b> .....	79
<b>3. 5. 1. Preparación de los cortes</b>	81
<b>3. 5. 2. Tratamientos previos a la hibridación</b>	81
<b>3. 5. 3. Hibridación</b>	82
<b>3. 5. 4. Lavados</b>	82
<b>3. 5. 5. Autorradiografía</b>	83
<b>3. 5. 6. Teñido y montaje</b>	84
<b>3. 5. 7. Microscopía</b>	84
<b>3. 6. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u></b> .....	86

## **4. RESULTADOS** **87**

---

<b>4. 1. <u>SISTEMA FIBRINOLÍTICO EN EXTRACTOS TISULARES</u></b> .....	88
4. 1. 1. Activadores fibrinolíticos	88
4. 1. 2. Inhibidores fibrinolíticos	91
<b>4. 2. <u>SISTEMA DE LAS MMPs EN EXTRACTOS TISULARES</u></b> .....	93
<b>4. 3. <u>CORRELACIONES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS METALOPROTEASAS</u></b> .....	95
4. 3. 1. Correlaciones del nivel antigénico y funcional	95
4. 3. 2. Correlaciones entre activadores e inhibidores	97
4. 3. 3. Muestras apareadas	100
<b>4. 4. <u>SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS MMPs EN FUNCIÓN DE LA RECIDIVA DE ENDOMETRIOSIS</u></b> .....	101
<b>4. 5. <u>SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS MMPs EN OTROS EXTRACTOS TISULARES</u></b> .....	104
4. 5. 1. Tejido ovárico	104
4. 5. 2. Implantes peritoneales	105
4. 5. 3. Líquido peritoneal	107
<b>4. 6. <u>INMUNOHISTOQUIMIA</u></b> .....	109
4. 6. 1. Endometrio de mujeres con y sin endometriosis	109
4. 6. 2. Tejido endometriósico	117

<b>4. 7. <u>HIBRIDACIÓN IN SITU</u></b> .....	121
<b>4. 7. 1. Endometrio de mujeres con y sin endometriosis</b>	122
<b>4. 7. 2. Tejido endometriósico</b>	122
<b><u>5. DISCUSIÓN</u></b>	<b>128</b>
<b><u>6. CONCLUSIONES</u></b>	<b>138</b>
<b><u>7. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>141</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## **1. INTRODUCCIÓN**

---

1. 1. Teorías fisiopatológicas de la endometriosis.	4
1. 2. Proceso de menstruación retrógrada	6
1. 3. Localización de la endometriosis	9
1. 4. Clasificación revisada de la <i>American Fertility Society</i> (AFSr) para la endometriosis	12
1. 5. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico	14
1. 6. Interrelación entre el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas	16
1. 7. Modelo estructural de la conformación de la molécula de tPA	17
1. 8. Modelo de unión de uPA a su receptor (uPAR).	19
1. 9. Modelo estructural de la conformación de la molécula de uPA	20
1. 10. Modelo estructural de la conformación de la molécula de PAI-1 en estado latente	23
1. 11. Modelo estructural de la conformación de la molécula de PAI-2 en estado latente	24
1. 12. Mecanismo de regeneración peritoneal	31
1. 13. Estructura del colágeno humano	34
1. 14. Estructura de MMP-3	35
1. 15. Estructura de las metaloproteasas humanas	37
1. 16. Modelo estructural de la conformación de la molécula de TIMP-1	39

1. 17. Cambios cíclicos de las metaloproteasas en el endometrio humano	42
1. 18. Regulación paracrina de las MMPs en el endometrio	46
1. 19. Fisiopatología de la endometriosis: líquido peritoneal y MMPs	51

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

3. 1. Fases del ciclo de la toma de muestras	59
3. 2. Esquema del desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica	78
3. 3. Esquema del desarrollo de la técnica de hibridación in situ	85

## **4. RESULTADOS**

---

4. 1. Niveles de activadores del plasminógeno en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis	90
4. 2. Niveles de inhibidores fibrinolíticos en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis	92
4. 3. Niveles de antígenos de MMP-3 y TIMP-1 en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis	94
4. 4. Correlación entre los niveles de uPA antigénico y funcional en la fracción citosólica de extractos de endometrio de mujeres con y sin endometriosis	95
4. 5. Correlación entre los niveles de PAI-1 antigénico y funcional en el tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis	96
4. 6. Correlación entre los niveles antígenos de uPA y PAI-1 en extractos de endometrio ectópico de mujeres con endometriosis y endometrio control	97
4. 7. Correlación entre los niveles antígenos de uPA y PAI-3 en extractos de endometrio ectópico y eutópico de mujeres con endometriosis	98
4. 8. Correlación entre los niveles de MMP-3 y TIMP-1 en extractos de endometrio ectópico de mujeres con endometriosis	99
4. 9. Localización de uPA en el endometrio control	111

4. 10. Localización de uPA en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis	112
4. 11. Localización de uPA en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis en fase proliferativa	113
4. 12. Localización de uPA en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis en fase secretora	114
4. 13. Localización de PAI-1 en el endometrio control	115
4. 14. Localización de PAI-1 en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis	116
4. 15. Localización mediante inmunohistoquímica de PAI-1 en el endometrio ectópico	118
4. 16. Localización de PAI-1 en el endometrio ectópico	119
4. 17. Localización de uPA y PAI-3 en el endometrio ectópico	120
4. 18. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrio control	123
4. 19. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrio eutópico	124
4. 20. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrioma	125
4. 21. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrioma	126
4. 22. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrioma	127

# ÍNDICE DE TABLAS

## **1. INTRODUCCIÓN**

---

- |  |    |
|--|----|
| 1. 1. Clasificación de las metaloproteasas matriciales humanas (MMPs). | 38 |
| 1. 2. Clasificación de los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs)   | 40 |

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

3. 1. Características clínico-quirúrgicas de las pacientes estudiadas.	58
3. 2. Tipo de cirugía realizada en cada grupo de pacientes.	59
3. 3. Características de las lesiones de endometriosis en función de la recidiva.	61

## **4. RESULTADOS**

---

4. 1. Niveles de activadores del plasminógeno en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis	89
4. 2. Niveles de inhibidores fibrinolíticos en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis	92
4. 3. Niveles de antígenos de MMP-3 y TIMP-1 en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis	94
4. 4. Niveles de uPAag, PAI-1ag y TIMP-1ag de las muestras apareadas en las mujeres con endometriosis	100
4. 5. Niveles de activadores del plasminógeno en extractos de endometrio de mujeres con endometriosis	101
4. 6. Niveles de inhibidores fibrinolíticos en extractos de endometrio de mujeres con endometriosis en función de la recidiva clínica.	102
4. 7. Niveles de MMP3 y TIMP-1 en extractos de endometrio eutópico de mujeres con endometriosis en función de la recidiva de la enfermedad.	103
4. 8. Niveles de componentes del sistema fibrinolítico y de las MMPs en las muestras de tejido endometriósico: implante vs endometrioma ovárico.	106
4. 9. Niveles de componentes del sistema fibrinolítico y de las MMPs en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis en función del estadio	106
4. 10. Parámetros fibrinolíticos y de las MMPs en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis	108

# **1.- INTRODUCCIÓN**

---

*Endometriosis: Fibrinólisis y Metaloproteasas. Introducción*

## **1. 1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENDOMETRIOSIS**

La endometriosis es una enfermedad caracterizada por la presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de la cavidad uterina. Es una de las enfermedades ginecológicas benignas más comunes y se estima que afecta del 10 al 15% de las mujeres en edad reproductiva. En mujeres estériles o con dolor pélvico, la prevalencia puede llegar hasta el 30%.

Existen referencias en relación a la localización aberrante del tejido endometrial desde hace más de 300 años en diversos documentos históricos de origen europeo (Knapp VJ, 1999). La primera descripción en una publicación científica data de 1690, aunque no fue hasta finales del siglo XIX cuando se describió con detalle lo que hoy entendemos por endometriosis (Von Rokitansky C, 1860; Russel WW, 1899). Sin embargo, fue Sampson quien definió las características morfológicas y semiológicas de esta enfermedad, de forma que a partir de entonces fue considerada como entidad clínica específica (Sampson JA, 1921). Desde entonces, son muchos los avances en la comprensión de los procesos fisiopatológicos involucrados en la génesis de la endometriosis, aunque los mecanismos íntimos de la misma continúan todavía sin conocerse completamente.

### **1. 1. 1. TEORIAS ETIOPATOGENICAS**

Durante más de 70 años se han formulado numerosas teorías para tratar de explicar el origen de esta enfermedad. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados hasta la fecha, su etiología permanece todavía desconocida.

Existen tres teorías más ampliamente aceptadas que permitirían explicar el desarrollo de esta enfermedad: 1) desarrollo por metaplasia peritoneal; 2) desarrollo por inducción desde restos de origen mulleriano; 3) implantación y crecimiento del tejido endometrial tras un proceso de menstruación retrógrada. Estas tres teorías pueden ser complementarias, ya que componentes de la menstruación pueden inducir una metaplasia y crecimiento de los restos mullerianos (Fujii S y col, 1991).

#### 1. 1. 1. 1. **Teoría de la metaplasia**

La teoría de la metaplasia sugiere que un epitelio con capacidad proliferativa, como es el caso del epitelio ovárico o la serosa peritoneal, puede transformarse por metaplasia en tejido endometrial (Cullen TS y col, 1896; Meyer R y col, 1903). Esta teoría permite explicar los raros casos encontrados de endometriosis en ausencia de menstruación (Doty DW y col, 1990; El Mahgoub S y col, 1980). Sin embargo, existen diversos aspectos clínicos que van en contra de esta teoría. Por un lado, el potencial de metaplasia peritoneal debería traducirse en la posibilidad del desarrollo de endometriosis masculina. Además, la metaplasia celómica debería manifestarse en todos los sitios del organismo en los que se encuentre tejido derivado del epitelio celómico. Por otra parte, si la metaplasia celómica es similar a la metaplasia común, entonces la frecuencia de endometriosis debería incrementarse progresivamente con la edad, aspecto que no se observa en la práctica clínica.

#### 1. 1. 1. 2. **Teoría de la inducción**

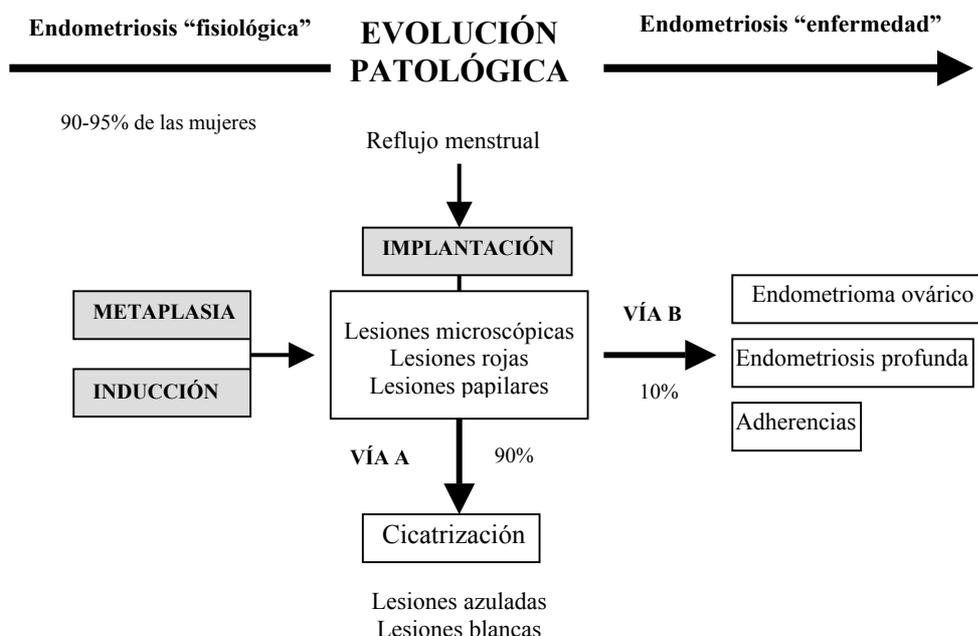
La teoría de la inducción es una extensión de la teoría celómica que propone que uno o varios factores endógenos, bioquímicos o inmunológicos podrían inducir la diferenciación endometrial de células indiferenciadas. Esta teoría se apoya en modelos de experimentación animal (Merrill JA y col, 1966). También modelos *in vitro* han observado metaplasia celómica del mesotelio cuando el epitelio de la superficie ovárica y células del estroma endometrial era cultivado junto a  $17\beta$  estradiol (Nakamura M y col, 1993; Matsuura K y col, 1999). Sin embargo, para conseguir esta transformación del epitelio ovárico se requieren concentraciones de  $17\beta$  estradiol 10 veces mayores a las observadas en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis. Esta concentración elevada tan sólo se encuentra en la proximidad del ovario y explicaría, por tanto, la endometriosis de esta localización.

### 1. 1. 1. 3. Teoría de la implantación

La teoría de la implantación propone la existencia de un reflujo de tejido endometrial durante la menstruación a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad abdominal, donde puede llegar a implantarse (Sampson JA y col, 1927 y 1940). Varias observaciones apoyan esta teoría: 1) el reflujo de células endometriales durante la menstruación es un fenómeno casi universal en presencia de trompas de Falopio normales (Kruitwagen RF y col, 1991); 2) la localización peritoneal de las lesiones endometriósicas corresponde a la región en contacto con el reflujo tubárico (Hoshiai H y col, 1993; Vercellini P y col, 1998); 3) las células endometriales recuperadas del abdomen al final de la menstruación tienen capacidad proliferativa; 4) las células endometriales expresan moléculas de adhesión (integrinas) en su superficie, lo que les confiere la capacidad de unirse al peritoneo (Tabibzadeh S y col, 1992; Koks CA y col, 1999; Wiltz CA y col, 2001); 5) tras migrar a la cavidad abdominal, los fragmentos de endometrio expresan metaloproteasas que son capaces de degradar la membrana basal y numerosos componentes de la matriz extracelular (Koks CA y col, 2000); 6) el endometrio produce factores angiogénicos que son esenciales para la neovascularización local (Mc Laren J y col, 2000); 7) el examen microscópico por laparoscopia del peritoneo sano identifica frecuentemente implantes endometriósicos (20% de los casos de esterilidad inexplicada) (Murphy AA y col, 1986 y 1990).

Estas teorías están apoyadas por abundantes datos y permitirían explicar la mayoría de localizaciones de la endometriosis. Sin embargo, quedan por explicar muchos otros aspectos de la enfermedad, como el hecho de que, siendo la menstruación retrógrada un proceso prácticamente universal, la endometriosis se desarrolle en tan sólo el 10-15% de la población general (Evers y col, 1995). Por otra parte, la frecuente presencia de un endometrioma único en el ovario, el diferente comportamiento de las lesiones peritoneales y la presencia de adherencias en extensiones muy variables, son hallazgos no completamente explicados por las teorías anteriormente expuestas.

Las lesiones peritoneales establecidas por alguno de los mecanismos citados evolucionan en su mayoría a la cicatrización (Belaisch J y col, 1999). Sin embargo, un porcentaje de ellas permanecen activas desencadenando lesiones profundas ováricas y peritoneales (*Figura 1. 1*).



**Figura 1. 1. Teorías fisiopatológicas de la endometriosis.** La menstruación retrógrada es un proceso fisiológico que ocurre en la mayoría de las mujeres. La mayoría de las lesiones endometriósicas iniciales sufren un proceso de cicatrización y pierden su actividad. Algunas de estas lesiones y en algunas de las mujeres siguen un proceso diferente que desemboca en una enfermedad con manifestaciones clínicas diferentes (Belaisch J y col, 1999, modificado)

#### 1. 1. 1. 4. Mecanismos etiopatogénicos a nivel tisular

Después de la diseminación de células endometriales durante la menstruación, la progresión de la endometriosis se produce en varias etapas: 1) reflujo; 2) adhesión; 3) proteólisis; 4) proliferación; 5) angiogénesis; 6) cicatrización. Existen diferentes mecanismos de protección fisiológica para interrumpir el proceso en cada etapa. El ambiente peritoneal de la mayoría de las mujeres es capaz de reabsorber el tejido endometrial presente al final de la menstruación. El reflujo peritoneal podría ser, por tanto, una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad.

Se han descrito dos mecanismos etiopatogénicos que podrían explicar el desarrollo de endometriosis sólo en algunas mujeres (*Figura 1. 2*). La primera teoría se basa en la existencia de un endometrio alterado capaz de resistir los mecanismos normales de depuración peritoneal (Belaisch J y col, 1999). La segunda teoría sugiere que la enfermedad es secundaria a alteraciones de los componentes celulares y humorales del líquido peritoneal que ocasionan una depuración deficiente. Esta incapacidad podría ser consecuencia de anomalías en algunos de los factores presentes en el ambiente peritoneal como pueden ser: 1) citoquinas y factores de crecimiento; 2) las células NK (*Natural Killer*); 3) los macrófagos; 4) el peritoneo; 5) la concentración de hormonas locales. Además, la presencia de alteraciones anatómicas podría empeorar la capacidad de depurado peritoneal o contribuir a aumentar el reflujo menstrual. Dentro de estos factores anómalos del ambiente peritoneal se han citado la hipertonia de la unión uterotubular (Ayers JWT y col, 1985), el desarrollo de ondas contráctiles retrógradas en la musculatura tubular y miometrial (Salamanca A y col, 1995) y la presencia de malformaciones uterinas que dificultan la menstruación anterógrada normal (Sanfilippo JS y col, 1986). Por otra parte, las menstruaciones en mujeres con endometriosis son con frecuencia más largas y abundantes (Vercellini P y col, 1997) y los ciclos tienen una tendencia a ser más cortos (Arumugam K y col, 1997).

*Figura 1. 2. Proceso de menstruación retrógrada. Durante la menstruación existen fragmentos de tejido endometrial que migran retrógradamente, a través de las trompas de Falopio, hasta la cavidad peritoneal. Estos fragmentos contienen numerosos factores, entre los que se incluyen citoquinas y diversos componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas.*

La adhesión al peritoneo del tejido endometrial proveniente del reflujo menstrual es la primera etapa necesaria en la teoría de la implantación. Los fragmentos del endometrio descamado han demostrado poseer capacidad de adhesión a la superficie epitelial en el amnios lesionado (Groothuis PG y col, 1998). Además, la exposición del endometrio a la acción de la progesterona durante 24 horas antes de su inyección intraperitoneal en modelos de experimentación animal ha demostrado disminuir su capacidad de implantación (Bruner KL y col, 1997). Las células endometriales aisladas, a diferencia de los fragmentos endometriales en los que se asocian glándulas y estroma, sólo tienen capacidad de adhesión a la matriz extracelular y no al peritoneo intacto (Van Der Linden PJ y col, 1996; Groothuis PG y col, 1998; Koks CA y col, 1999). La exposición de la matriz extracelular del mesotelio podría ser el resultado de una actividad enzimática excesiva, evidenciada por un mayor nivel de proteasas que actuarían sobre un peritoneo previamente debilitado. Existen numerosos factores que pueden dañar el peritoneo (cirugía, toxinas, bacterias, células inflamatorias...), y así explicar la alta frecuencia de implantes endometriósicos microscópicos en biopsias randomizadas de peritoneo aparentemente normal (Murphy AA y col, 1986; Redwine DB y col, 2003).

Existen mecanismos celulares y humorales responsables de mantener la homeostasis del ambiente peritoneal. Los macrófagos constituyen el 85% de las células del líquido peritoneal (Martínez-Román S y col, 1997). Su número y nivel de activación varía a lo largo del ciclo menstrual, con un máximo en el periodo postmenstrual con el fin de eliminar de la cavidad peritoneal los restos endometriales, espermatozoides y células foliculares. En las mujeres con endometriosis los macrófagos están aumentados en número (Martínez-Román S y col, 1997) y tienen un nivel mayor de activación (Hill JA y col, 1988; Raiter-Tenenbaum A y col, 1998). Por otro lado, las células NK del líquido peritoneal participan en la purificación de la cavidad peritoneal gracias a su actividad citotóxica sobre células extrañas (Ho HN y col, 1995; Iswasaki KI y col, 1993). Además, la citotoxicidad de células NK circulantes y peritoneales está reducida en mujeres con endometriosis, a pesar de que el número de las mismas es normal (Oosterlynck KJ y col, 1992 y 1994a).

### 1. 1. 2. EPIDEMIOLOGÍA

La endometriosis es una enfermedad frecuente en nuestro medio en la que influyen factores personales y demográficos que es necesario conocer. Su prevalencia en mujeres asintomáticas sometidas a esterilización tubárica es alrededor del 4% (Strathy JH y col, 1982; Mahmood TA y col, 1991; Sangi-Haghpeykar H y col, 1995). En el 15% de las mujeres con esterilidad primaria se diagnostica endometriosis (Cramer DW y col, 1986), mientras que en las mujeres con dolor pélvico la prevalencia de la misma varía de un 5 a un 20% (Duignan NH y col, 1972; Hasson HM, 1976; Kleppinger RK, 1976). Las adolescentes con dismenorrea severa o dolor pélvico constituyen un grupo de pacientes con una alta probabilidad de padecer endometriosis, ya que en ellas se ha cifrado una prevalencia de la enfermedad de hasta el 50% (Bullock JL y col, 1974; Goldstein DP y col, 1980; Eskenazi B y Warner M, 1997).

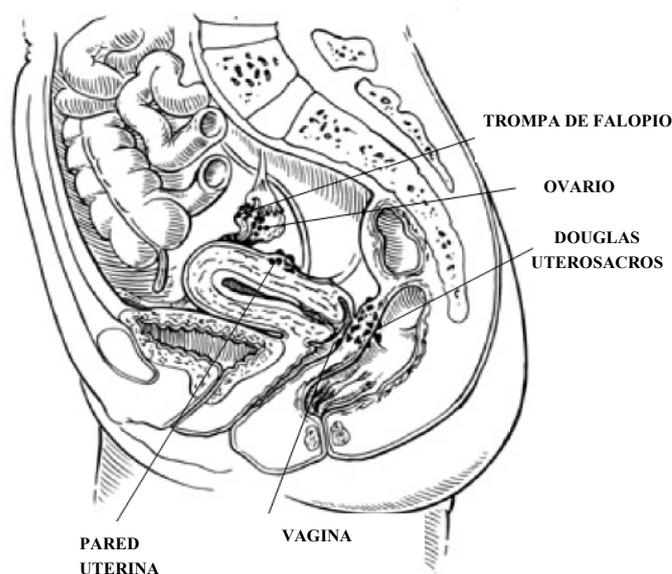
La edad es un factor determinante de la aparición de la enfermedad. La endometriosis se correlaciona con el periodo de actividad sexual, con un pico de presentación alrededor de los 40 años. Este hecho apoya la implicación patogénica del ambiente estrogénico en el desarrollo de esta enfermedad. Dos estudios clínicos sugieren diferencias en la distribución étnica de esta enfermedad y apuntan que en comparación con las mujeres de raza blanca, las mujeres de raza negra tienen un riesgo incrementado, mientras que las de raza oriental lo tienen disminuido (Hasson HM, 1976; Sangi-Haghpeykar H y col, 1995). La dismenorrea está fuertemente asociada con el riesgo de endometriosis, pero se ha interpretado frecuentemente tan sólo como un síntoma de la enfermedad (Cramer DW y col, 1986; Signorello LB y col, 1997; Darrow SL y col, 1993). Otros factores de riesgo relacionados con el ciclo menstrual son la edad precoz de la menarquia y la duración corta del ciclo (Signorello LB y col, 1997; Parazzini F y col, 1995; Moen MH y col, 1997; Arumungan K y col, 1997).

Existen factores constitucionales y genéticos relacionados con la endometriosis. Se han encontrado relaciones inversas con el peso y el índice de masa corporal y un incremento de riesgo con la altura (Signorello LB y col, 1997; Darrow SL y col, 1993). Esto podría explicarse por el hecho de que las mujeres más altas tienen un nivel de estradiol mayor en la fase folicular (Dorgan JF y col, 1995). Por otro lado, el ejercicio

regular, capaz de reducir los niveles de estrógenos (Baker ER y col, 1981), se ha asociado con un riesgo menor de endometriosis (Cramer DW y col, 1986; Darrow SL y col, 1993; Moen MH y col, 1997). Por último, existen factores genéticos implicados en la patogenia de esta enfermedad (Stefanson H y col, 2002). Así, las mujeres con endometriosis tienen una mayor probabilidad de tener una madre o una hermana con la enfermedad (Coxhead D y Thomas EJ, 1993; Moen MH y Magnus P, 1993) y además existe una concordancia de esta enfermedad entre gemelos monocigóticos (Hadfield RM y col, 1997).

### 1. 1. 3. ASPECTOS CLÍNICOS

La localización habitual de la endometriosis es la pelvis, en especial los ovarios y las áreas cercanas que están cubiertas por peritoneo, como es el caso del fondo de saco de Douglas, el ligamento ancho y los ligamentos uterosacros (*Figura 1. 3*). No obstante, se ha evidenciado la presencia de implantes endometriósicos a distancia, por lo que es necesario definir la extensión de la enfermedad y disponer de un sistema de clasificación de la misma adecuado.



**Figura 1. 3. Localización de la endometriosis.** La endometriosis se localiza en las regiones cercanas a las fimbrias de ambas trompas de Falopio, situación clínica que refuerza la teoría de la menstruación retrógrada como factor determinante en la patogenia de la enfermedad (Healthsquare Website, 1997).

Los síntomas más frecuentes de la endometriosis son la dismenorrea, la dispareunia, el dolor pélvico crónico y la esterilidad. La dismenorrea asociada a la endometriosis avanzada responde mal a los agentes antiinflamatorios no esteroideos y a los anticonceptivos orales. El dolor pélvico puede predominar al principio de la menstruación o convertirse en crónico y extenderse a lo largo de todo el ciclo, por lo que en ocasiones resulta invalidante. Cuando existe afectación de los ligamentos uterosacros o del tabique rectovaginal, el dolor se localiza a nivel rectal o lumbar, y puede incluso irradiar al miembro inferior.

Asimismo, la dispareunia está frecuentemente asociada con la afectación rectovaginal o de los ligamentos uterosacros. También se presenta cuando existe fijación del útero o los ovarios por adherencias, en especial si coexiste un endometrioma. Sin embargo, otros autores han relacionado el dolor pélvico con la presencia de endometriosis profunda infiltrante, independientemente de la presencia de endometriomas o adherencias (Balasch J y col, 1996; Konickx PR y col, 1996). Es importante comprender el amplio espectro clínico de esta enfermedad para poder interpretar los estudios sobre su fisiopatología.

La esterilidad se ha asociado durante mucho tiempo a la endometriosis, siendo su prevalencia en presencia de esta enfermedad diez veces superior que en la población general (Strathy JH y col, 1982; Simón C y col, 1994; Arici A y col, 1996; Berubés y col, 1998; Pellicer A y col, 2001; Navarro J y col, 2003). La endometriosis es claramente responsable de la esterilidad cuando se acompaña de obstáculos anatómicos para la captación ovocitaria por el pabellón tubárico. Esto es evidente en los casos de endometriosis avanzada, donde se producen adherencias y lesiones fibrosas que distorsionan la anatomía de los órganos vecinos y alteran la función reproductiva (García CR y col, 1977; Ruiz Navas MT y col, 1986; Matorras RF y col, 1995). También los quistes endometriósicos pueden ser responsables de la esterilidad, debido a la reducción de la producción ovocitaria y la producción de adherencias tras su ruptura espontánea. En estos casos, el tratamiento médico es ineficaz y es necesario realizar una cirugía conservadora y reconstructora de la anatomía pélvica distorsionada.

La endometriosis es una enfermedad compleja, ya que las localizaciones ectópicas pueden ser múltiples y de aspecto variable. Es importante disponer de una clasificación simple y de carácter descriptivo, que permita comparar los resultados entre los diferentes estudios. Se han propuesto numerosas clasificaciones que no cumplían estos criterios (Wicks MJ y Larson CP, 1949; Huffman JW, 1951; Acosta AA y col, 1973; Kistner RW, 1977). Actualmente la más utilizada es la clasificación revisada de la *American Fertility Society (AFSr)*. Se basa en la descripción de la localización y la extensión de las lesiones evidenciadas durante el examen laparoscópico o laparotómico (*AFS*, 1979 y 1985; *AFSr*, 1997). Propone una exhaustiva clasificación en estadios según un sistema de puntuación: estadio I, endometriosis mínima (1 a 5 puntos); estadio II, leve (6 a 15 puntos); estadio III, moderada (16 a 40 puntos); estadio IV, severa (más de 40 puntos) (*Figura 1. 4*).

El diagnóstico de la endometriosis puede hacerse teóricamente de cuatro formas: 1) diagnóstico clínico basado en la historia, el examen físico y las técnicas de imagen no invasivas; 2) visualización directa de las lesiones endometriósicas; 3) confirmación histopatológica de una biopsia quirúrgica de las lesiones sospechosas; y 4) cuantificación de marcadores bioquímicos, como el CA-125. El diagnóstico clínico y bioquímico de la endometriosis tiene un bajo valor predictivo positivo y ha sido cuestionado por numerosos autores (Hornstein MD y col, 1992; Pittaway DE y Fayez JA, 1986). El análisis histopatológico de las biopsias es la única herramienta útil para el diagnóstico definitivo de la enfermedad, aunque no siempre es posible obtener suficiente material para el estudio, particularmente en las formas de afectación mínima. Los criterios histológicos para el diagnóstico de endometriosis incluyen la presencia de uno de los siguientes componentes: 1) glándulas endometriales y estroma; 2) epitelio glandular con hemosiderina, o 3) tejido estromal con hemosiderina. La ecografía permite identificar únicamente los quistes endometriósicos, aunque existen falsos positivos con otras patologías quísticas de los anexos. Actualmente se considera que el diagnóstico de endometriosis debe hacerse mediante visualización directa de las lesiones endometriósicas durante la cirugía laparoscópica o laparotómica (Petit Cabello J y col 1986; Strippling MC y col, 1988; Martin DC y col, 1993; Ueki M y col, 1995).

Aunque la endometriosis es una enfermedad benigna posee un comportamiento en muchos aspectos similar al cáncer. De manera análoga a la progresión tumoral, se produce un proceso de implantación e invasión de tejidos sanos previa destrucción de la matriz extracelular, en la que puede estar implicado el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas.

**Clasificación revisada de la endometriosis de la American Fertility Society: 1985**

Nombre de la paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Etapa I (mínima) 1-5      Laparoscopia \_\_\_\_\_ Laparotomía \_\_\_\_\_ Fotografía \_\_\_\_\_  
 Etapa II (leve) 6-15  
 Etapa III (moderada) 16-40      Tratamiento recomendado \_\_\_\_\_  
 Etapa IV (grave) > 40  
 Total \_\_\_\_\_      Pronóstico \_\_\_\_\_

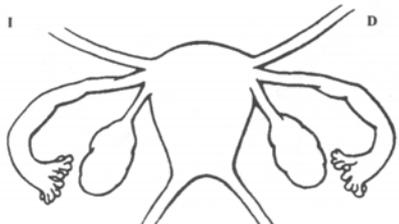
PERITONEO	ENDOMETRIOSIS	< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm
	Superficial	1	2	4
Profunda	2	4	6	
OVARIO	Der. superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
	Izq. superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
OBLITERACION DEL FONDO DE SACO POSTERIOR		Parcial	Completa	
		4	40	
OVARIO	ADHERENCIAS	Abarcan < 1/3	Abarcan 1/3 a 2/3	Abarcan > 2/3
	Der. en pellicula	1	2	4
	Densas	4	8	16
	Izq. en pellicula	1	2	4
Densas	4	8	16	
TROMPA	Der. en pellicula	1	2	4
	Densas	4*	8*	16
	Izq. en pellicula	1	2	4
	Densas	4*	8*	16

\* Si está totalmente encerrado el extremo fimbriado de la trompa de Falopio, cambiar el punto de asignación a 16

Endometriosis adicional: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Patología acompañante: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Para emplearse con las trompas y los ovarios normales



Para emplearse con trompas, ovarios o ambos anormales



**Figura 1. 4. Clasificación revisada de la American Fertility Society (AFSr) para la endometriosis.** El sistema de clasificación de la Sociedad Americana de Fertilidad (1985), se basa en el aspecto, tamaño y profundidad de los implantes peritoneales y ováricos, en la presencia, la extensión y el tipo de adherencias de los anexos, y en el grado de obliteración del fondo de saco de Douglas.

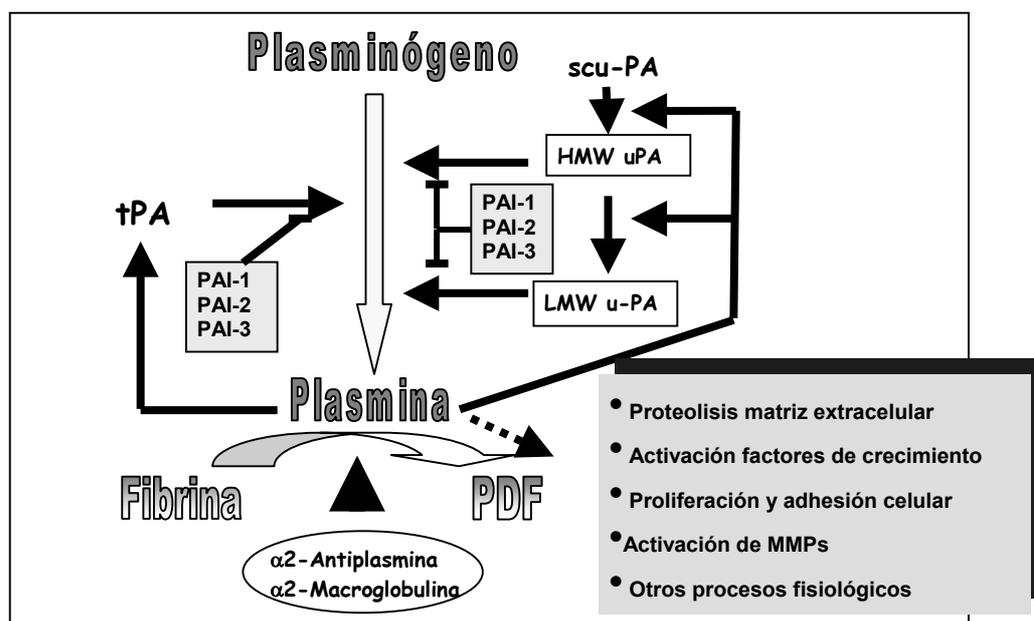
## **1. 2. ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA FIBRINOLÍTICO**

### **1. 2. 1. ASPECTOS GENERALES DE LA FIBRINOLISIS**

El término fibrinólisis fue introducido hace más de un siglo por Dastre para describir la disolución espontánea de coágulos sanguíneos (Dastre, 1893). A pesar del tiempo transcurrido desde entonces podemos decir que esta definición de la fibrinólisis, como el conjunto de mecanismos encargados de deshacer el coágulo de fibrina una vez formado, sigue siendo precisa. Sin embargo, el sistema fibrinolítico está involucrado también en diversos procesos biológicos tan importantes como la reproducción humana, la regeneración tisular, la invasión tumoral y la endometriosis (Parrilla JJ y col, 1975 a y b; Tomás Martínez JF y col, 1991; Ny T y col, 1993; Pepper MS y col, 1993; Castelló R y col, 2002; Gilabert-Estellés J y col, 2003).

El funcionamiento del sistema fibrinolítico tiene como base la conversión de una proenzima, el plasminógeno, en su enzima proteolíticamente activa, la plasmina, capaz de degradar el coágulo de fibrina (Collen D y Lijnen HR, 1991; Lijnen HR y Collen D, 1993) (*Figura 1. 5*). La transformación del plasminógeno en plasmina activa se produce mediante la acción proteolítica de dos enzimas, denominados respectivamente activador tisular del plasminógeno (tPA) y activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Como en cualquier proceso biológico regulado, a esta tendencia profibrinolítica se opone una actividad antifibrinolítica, de tal modo que sólo un adecuado equilibrio entre ambas fuerzas dará lugar a un correcto funcionamiento del sistema global. Esta tendencia antifibrinolítica está mediada por la acción de los inhibidores naturales de los activadores del plasminógeno. Estos inhibidores se denominan inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 o de tipo endotelial (PAI-1), e inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 2 o placentario (PAI-2). Existe un tercer inhibidor de los activadores del plasminógeno denominado inicialmente PAI-3 y que más tarde fue identificado como uno de los inhibidores de la proteína C activada (PCI) (Heeb MJ y col, 1987; España F y col, 1989b). Dicho inhibidor es capaz de inhibir a la uPA y al tPA de dos cadenas pero, aunque su concentración plasmática es superior a la de los otros PAIs, su actividad inhibitoria a nivel fibrinolítico es menor (Stump DC y col, 1986 a y b; España F y col, 1993a).

La actividad proteolítica de la plasmina formada mediante el proceso de activación del plasminógeno está además regulada por la acción de la  $\alpha_2$ -antiplasmina, su principal inhibidor fisiológico y, en menor medida, por la  $\alpha_2$ -macroglobulina. Todos estos factores son determinantes del proceso de fibrinólisis, de tal modo que una correcta hemostasia dependerá del balance de fuerzas entre todas estas tendencias opuestas. Además de su función fibrinolítica a nivel plasmático, la plasmina tiene una importante función proteolítica a nivel tisular. Interviene en procesos de proliferación y adhesión celular, posee actividad proteolítica sobre la matriz extracelular y regula la activación de factores de crecimiento y metaloproteasas. También interviene en procesos fisiológicos como la menstruación, la ovulación y la implantación embrionaria (Sappino AP y col, 1989; Liu YX, 1999) y en situaciones patológicas como la endometriosis (Bruse C y col, 1998; Gilabert-Estellés J y col, 2003) o el cáncer (Dano K y col, 1985; Castelló R y col, 2002 ).



**Figura 1. 5. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico.** tPA: activador tisular del plasminógeno; uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; scu-PA: activador de uPA de una cadena; HMW uPA: activador de uPA de alto peso molecular; LMW uPA: activador de uPA de bajo peso molecular; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; PDF: productos de degradación de la fibrina.

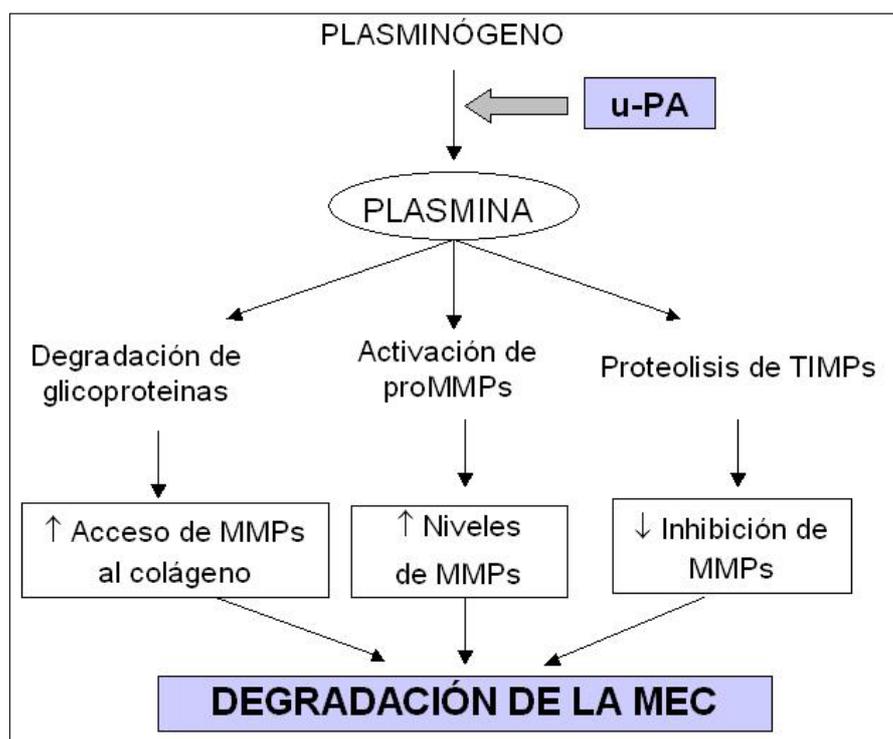
## 1. 2. 2. PLASMINÓGENO Y PLASMINA

El plasminógeno es una glicoproteína sintetizada fundamentalmente en el hígado, aunque también se han descrito otros lugares de síntesis como los eosinófilos o las células renales. Los niveles de plasminógeno en el plasma son relativamente constantes. Las concentraciones plasmáticas del plasminógeno no varían excesivamente con la edad ni con el sexo. Sin embargo, se han descrito hipoplasminogenemias o displasminogenemias congénitas como causa de tromboembolismo venoso (Robbins KC, 1992; Estellés A y Gilabert J, 1992; Aznar J y col, 1994b).

La plasmina es la forma enzimáticamente activa del plasminógeno, que tiene como sustrato más específico la fibrina y el fibrinógeno. La plasmina se une a la  $\alpha_2$ -antiplasmina por los lugares de unión a la lisina (*LBS*) y por el centro activo. Por ello, cuando la plasmina está unida a la fibrina no se inactiva y actúa como un eficaz fibrinolítico. También a través de los *LBS* el plasminógeno y la plasmina son capaces de interactuar con los receptores del plasminógeno que existen en la superficie de la célula endotelial y de otras células (Plow EF y col, 1991). Estos receptores modulan el proceso de fibrinólisis y en particular los procesos proteolíticos relacionados con la migración celular que tienen lugar en la superficie celular. Cuando la plasmina actúa sobre el fibrinógeno o fibrina da lugar a los llamados productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina.

La plasmina ejerce su acción enzimática a nivel tisular de forma directa, mediante la proteólisis de diversos componentes de la matriz extracelular. Asimismo, regula los niveles de las metaloproteasas de la matriz extracelular, ya que produce una activación de los zimógenos inactivos y además posee una acción proteolítica sobre los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (*Figura 1. 6*). Por otra parte, la plasmina produce directamente una degradación enzimática de diversas glicoproteínas de la matriz extracelular, lo que contribuye al proceso de remodelado tisular y al acceso de las metaloproteasas al colágeno sobre el que ejercerán su acción (Vassalli JD y col, 1991).

La plasmina es capaz de degradar directamente los componentes principales de la membrana basal y de la matriz extracelular, y de forma indirecta mediante la activación de las metaloproteasas matriciales, encargadas de degradar los componentes resistentes a la plasmina (Saksela O y Rifkin DB, 1990; Vassalli JD y col, 1991). Además, junto al activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), la plasmina posee capacidad de activar y liberar factores de crecimiento unidos a la matriz extracelular o a la superficie celular. Se ha descrito que la unión de la uPA a su receptor (uPAR), no sólo activa al plasminógeno, sino que también desencadena una cascada de señales celulares que regulan los procesos de migración celular en condiciones fisiológicas y patológicas, como es el caso de la angiogénesis, la implantación embrionaria, la reacción inflamatoria, la cicatrización cutánea y la implantación de metástasis tumorales (Carmeliet P y col, 1994; Andreasen PA y col, 1997; Mazar AP, 2001).

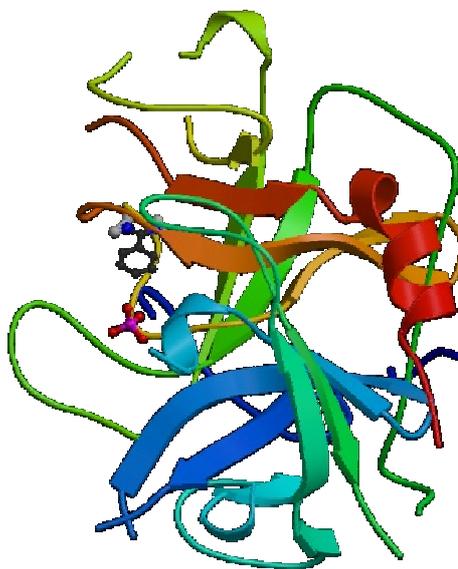


**Figura 1. 6. Interrelación entre el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas (MMPs).** La plasmina ejerce su acción proteolítica sobre la matriz extracelular tras su activación por la uPA, de forma directa o indirectamente por aumentar los niveles de MMPs, facilitando así su acceso al colágeno de la MEC. uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; TIMPs: inhibidores tisulares de las MMPs; MEC: matriz extracelular (Mignati P y Rifkin DB, 1993).

### 1. 2. 3. ACTIVADORES FIBRINOLÍTICOS

#### 1. 2. 3. 1. Activador tisular del plasminógeno (tPA)

El tPA es una serín-proteasa que se sintetiza fundamentalmente en las células endoteliales y está presente en el plasma (*Figura 1. 7*). En su mayor parte se puede encontrar formando complejos con el PAI-1 y sólo alrededor del 5% se puede detectar en forma libre en el plasma. Una de las características más interesantes del mecanismo de acción del tPA es su débil actividad enzimática en un sistema purificado. Sin embargo, esta actividad aumenta espectacularmente en presencia de fibrina o de fragmentos de ésta (Bachmann F y Kruithof EK, 1984). Esto es debido a que la fibrina promueve la interacción del tPA con su sustrato mediante el aumento de la concentración local de plasminógeno. La gran afinidad del tPA por el plasminógeno en presencia de fibrina da como resultado una eficiente activación del plasminógeno en la zona del coágulo, mientras que la activación en el plasma circulante permanece muy reducida. La función de este potente activador del plasminógeno es determinante en el proceso de fibrinólisis a nivel endotelial, siendo su actividad proteolítica tisular de menor importancia que el activador del plasminógeno tipo uroquinasa.



*Figura 1. 7. Modelo estructural de la conformación de la molécula de tPA. Las flechas indican regiones de  $\beta$ -hoja, mientras que las espirales indican dominios de  $\alpha$ -hélice (Agnelli G , 1993)*

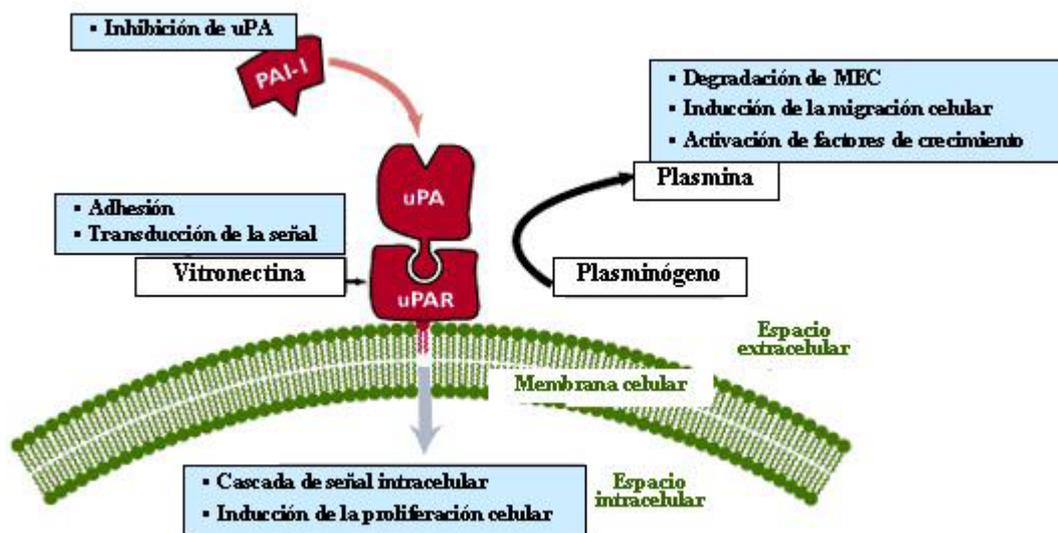
### 1. 2. 3. 2. **Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)**

La uPA es una serín-proteasa de tipo tripsina, aislada inicialmente de la orina humana en forma de doble cadena (tcu-PA). Sin embargo, la uPA se sintetiza inicialmente como una molécula de una sólo cadena polipeptídica (scu-PA) (Holmes WE y col, 1985). Tras una digestión parcial por parte de la plasmina o la kalikreína, la molécula se convierte en la forma de doble cadena denominada también uroquinasa de alto peso molecular (HMW-uPA). La scu-PA actúa directamente sobre el plasminógeno generando plasmina. A continuación, la plasmina convierte la scu-PA en tcu-PA, y ésta dirige finalmente la rápida activación del plasminógeno. En otros experimentos de activación del plasminógeno, en presencia de PAI-1, se puede concluir que la actividad de la scu-PA es tan sólo de un 0,1% en relación a la expresada por la tcu-PA (Orfeo T y col, 1990). Por otro lado, la tcu-PA no tiene especificidad por la fibrina y activa el plasminógeno libre o unido a fibrina indiscriminadamente, a diferencia de la scu-PA que tiene una marcada especificidad por la fibrina.

La uPA fue descrita inicialmente en cultivos de células de carcinoma ovárico (Astedt B y Holmberg L, 1976) y, posteriormente, se evidenció también su producción por la mayor parte de tumores malignos (Dano K y col, 1985; Laiho M y Keski-Oja J, 1989; Casslen B y Astedt B, 1995; Andreasen PA y col, 1997). Mientras que la activación del tPA es importante para el proceso de fibrinólisis, la uPA modula el proceso proteolítico pericelular de la matriz extracelular. La vía de la uPA juega, en general, un papel importante en la fisiología uterina (Littlefield BA, 1991) y, más concretamente, en el inicio de la menstruación (Tabibzadeh S, 1996). La expresión de uPA está regulada por mecanismos paracrinos y factores esteroideos (Casslen B y col, 1992; Schatz y Lockwood, 1993). La uPA puede ser inactivada por progesterona en cultivos de células endometriales estromales debido a un aumento de la expresión de PAI-1 y de uPA-R en la superficie celular (Casslen B y col, 1995b).

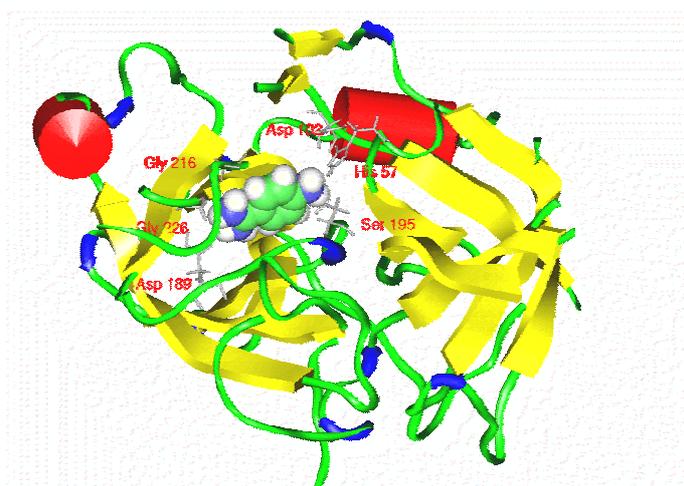
A nivel celular, la uPA se une específicamente a su receptor (uPAR) expresado en diferentes tipos celulares (*Figura 1. 8*) (Behrendt N y col, 1990). Este receptor de superficie parece jugar un papel central en la regulación de la proteólisis extracelular. Recientemente, se ha descrito una forma soluble del uPAR, denominada su-PAR,

codificada por el mismo gen que el receptor de superficie (Pyke y col, 1993; Mizukami y col, 1995). La unión de la uPA a uPAR, está implicada en diferentes procesos biológicos, como la migración celular, la regeneración tisular y el proceso de invasión tumoral. Además el uPAR podría actuar como receptor de la matriz extracelular durante el proceso de adhesión celular (Chintala SK y col, 1997). Por otra parte, la sobreexpresión de uPAR incrementa considerablemente la capacidad invasiva de las células tumorales, como se ha evidenciado para el cáncer de mama (Bianchi E y col, 1994; Duggan C y col, 1995). Los complejos uPA:uPAR son susceptibles de inhibición por los PAIs, lo que podría jugar un papel importante en el control de la activación del plasminógeno a nivel tisular y la proteólisis de la matriz extracelular. Estudios recientes indican que el su-PAR puede incrementar la disponibilidad local de uPA debido al enlentecimiento de la inhibición por PAI-1 y a la disminución de su aclaramiento (Al Roof Higazi y col, 1996).



**Figura 1. 8. Modelo de unión de uPA a su receptor (uPAR).** El receptor de uPA, uPAR, está anclado a la superficie de las células endometriales. La molécula de uPA es secretada y se une con gran afinidad y especificidad al uPAR. Esta unión activa la uPA limitando la actividad proteolítica en la superficie celular. Los componentes de la matriz extracelular son degradados por la plasmina, facilitando la migración celular y la angiogénesis. La vitronectina interacciona con el uPAR desencadenando una activación de la cascada de señal intracelular (Wilex AG, 2003; Seiffert D y col, 1991). MEC: matriz extracelular.

La generación controlada de plasmina unida a la superficie de las células puede modular su capacidad de migración e invasión de tejidos al regular las interacciones entre las células, la membrana basal y la matriz extracelular (Roldan AL y col, 1990). La cascada proteolítica dependiente de uPA regula la adhesión y migración celular y está envuelta en los mecanismos de proliferación celular y recambio tisular (Dano K y col, 1985; Casslen B y col, 1995b). Además la uPA es capaz de degradar la matriz extracelular en ausencia de plasminógeno (Laiho M y Keski-Oja J, 1989). Por otra parte, se ha descrito una asociación de uPA a nivel de la membrana basal de la glándula endometrial en relación con la hiperplasia y el adenocarcinoma de endometrio (Soszka T y Olsewski K, 1986; Bulleti C y col, 1991) y con el cáncer de ovario (Casslen B y col, 1995a).



*Figura 1. 9. Modelo estructural de la conformación de la molécula de la uPA. Las flechas indican regiones de β-hoja, mientras que las espirales indican dominios de α-hélice (Agnelli G, 1993)*

#### 1. 2. 4. INHIBIDORES FIBRINOLÍTICOS

Se han descrito diversas proteínas con actividad inhibitoria sobre la activación del plasminógeno, a las que se les ha denominado inhibidores de los activadores del plasminógeno o PAIs. Estos son el PAI-1 o endotelial (Loskutoff DJ y col, 1983; Van Meijer M y Pannekoek H, 1995) y el PAI-2 o placentario (Bachmann F, 1995), ambos de la familia de las serpinas, y el PAI-3, idéntico al inhibidor de la proteína C (Suzuki O y col, 1983; España F y col, 1989a).

La mayoría de estos inhibidores fibrinolíticos pertenecen a la familia de las serpinas. Las serpinas son proteínas de una alta homología derivadas de un gen ancestral común de hace 500 millones de años (Travis J y Salvesen GS, 1983; Huber R y Carrell RW, 1989). Las serpinas mejor estudiadas son aquellas que se encuentran en el plasma humano, donde actúan como inhibidores de las serín-proteasas para intervenir en los procesos de coagulación, fibrinólisis, inmunidad e inflamación.

##### 1. 2. 4. 1. Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1)

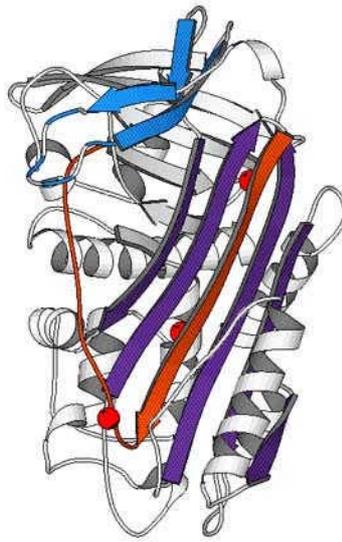
La estructura del PAI-1 humano ha sido ampliamente estudiada (*Figura 1. 10*). Se trata de una glicoproteína de cadena única sintetizada y secretada por una gran variedad de tipos celulares en cultivo (Loskutoff DJ y col, 1988), incluyendo las células endoteliales (Loskutoff DJ y col, 1983). Estudios de homología demuestran que el PAI-1 forma parte de la superfamilia de los inhibidores de las serín-proteasas o serpinas. El PAI-1 es una proteína relativamente termoestable cuando se encuentra depositada sobre la matriz subendotelial (Mimuro J y col, 1987). La principal causa de este incremento de estabilidad es la presencia en la matriz subendotelial de una glicoproteína, la vitronectina, la cual es capaz de unir PAI-1, estabilizándolo (Tucker HM y col, 1995).

El PAI-1 es capaz también de inhibir a la trombina en presencia de heparina de alto peso molecular (Ehrlich HJ y col, 1991). Parece que la significación de la inhibición de la trombina por parte del PAI-1, en presencia de heparina de alto peso molecular y de vitronectina, debe ser importante para la regulación de procesos proteolíticos de la matriz extracelular.

La sangre contiene dos grandes reservorios de PAI-1 (Erickson LA y col, 1984; Sprengers ED y col, 1986). Las plaquetas constituyen la principal reserva de PAI-1, conteniendo de 4000 a 8000 moléculas por célula (100-200 ng/ml de sangre) (Kruithof EK y col, 1986), mientras que una parte menor está presente en el plasma (alrededor de 10 ng/ml).

El PAI-1 se ha considerado como el principal regulador de la fibrinólisis *in vivo* (Loskutoff DJ y col, 1988 y 1991). Se han observado con frecuencia niveles anormalmente elevados de PAI-1 en condiciones en las que el riesgo trombótico está aumentado, como la gestación (Kruithof EK y col, 1987; Estellés A y col, 1989a; Estellés A y col, 1990; Estellés A y col, 1994; Vicente V y col, 1994) y en ciertas complicaciones obstétricas como la preeclampsia (Estellés A y col, 1987, 1989a, 1991 y 1996; Gilabert J y col, 1995a y b). También se detecta un aumento de sus niveles en el plasma de pacientes con trombosis venosa profunda (Juhan-Vague I y col, 1987; Tabernero MD y col, 1989) y en pacientes con infarto de miocardio (Estellés A y col, 1985 y 1989b; Almer L y col, 1987; Aznar J y col, 1988 y 1994a).

La actividad fibrinolítica en el tejido endometrial humano es esencial en el proceso de regeneración tisular durante la menstruación (Parrilla JJ y col, 1972). La actividad plasmínica, regulada por el nivel de inhibidores, determinará la proteólisis de las proteínas de la matriz extracelular, la activación de procolagenasas, y la degradación de diversos componentes de la membrana basal. La progesterona produce una disminución de la actividad fibrinolítica del endometrio mediante el estímulo de la degradación de uPA y el aumento de PAI-1 y uPAR (Casslen B y col, 1995b).

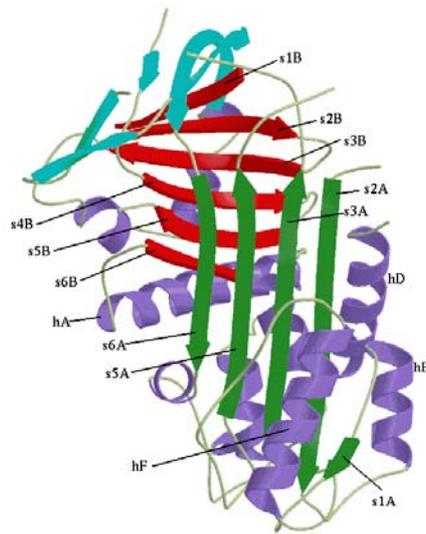


**Figura 1. 10. Modelo estructural de la conformación de la molécula del PAI-1 en estado latente.** Las flechas indican regiones de  $\beta$ -hoja mientras que las espirales indican dominios de  $\alpha$ -hélice (Tucker HM y col, 1995).

Por último, hay que citar la implicación del PAI-1 en los procesos tumorales (Jankun J y col, 1993; Harbeck N y col, 201; Palmieri D y col, 2002). En este sentido, es importante resaltar el papel que actualmente se le concede a la uPA y a su receptor, uPAR, en los procesos de migración y degradación proteolítica de la matriz extracelular durante el desarrollo de las metástasis. A pesar de no conocerse en detalle el significado de este hecho, los niveles de PAI-1 y uPA son considerados importantes parámetros pronósticos y pueden tener una creciente importancia terapéutica en algunos tipos de cáncer (Ruiz MA y col, 1989; Janicke F y col, 1993).

#### 1. 2. 4. 2. Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 2 (PAI-2)

El PAI-2 fue descubierto en la placenta humana a finales de los años 60 al purificar una fracción proteica que poseía la capacidad de inhibir a la uPA. Posteriormente se detectó su presencia en monocitos y macrófagos (Golder JP y col, 1983) y comenzó a conocerse su secuencia aminoácida (Kruithof EK y col, 1986). La homología de secuencia con muchas otras serpinas reveló que este inhibidor del activador del plasminógeno pertenecía a esta superfamilia (Figura 1. 11).



**Figura 1. 11. Modelo estructural de la conformación de la molécula del PAI-2 en estado latente.** Las flechas indican regiones de  $\beta$ -hoja mientras que las espirales indican dominios de  $\alpha$ -hélice (Bachmann F, 1995).

El PAI-2 es capaz de inhibir al tPA y a la uPA de la misma manera que hace el PAI-1. Sin embargo, no se han detectado complejos tPA:PAI-2 en plasma, ni siquiera durante la gestación, cuando la concentración de PAI-2 supera a la de PAI-1 (Estellés A y col, 1989a; Kruithof EK, 1995). Por ello, la función fisiológica del PAI-2 sigue siendo tema de controversia.

El PAI-2 se sintetiza en monocitos, macrófagos y en el tejido placentario, de tal modo que, bajo condiciones fisiológicas normales, resulta indetectable su presencia en plasma en mujeres no gestantes. Esto hace pensar que su participación en la hemostasia debe circunscribirse a procesos muy concretos, como puede ser el caso de la gestación. Además, la concentración de PAI-2 en el plasma de la mujer gestante se correlaciona con la edad gestacional, lo cual parece lógico, ya que la placenta es la principal fuente de producción de PAI-2 (Andrés C y col, 1989). En principio puede pensarse que la función que desempeña es contribuir, junto con el PAI-1, a mantener el estado hipofibrinolítico propio del embarazo.

Más complicado resulta esbozar una hipótesis sobre la función de la fracción de PAI-2 intracelular, fracción que es además mayoritaria y que no parece destinada a liberarse tras un proceso de acumulación. Se ha sugerido que el PAI-2 intracelular podría tener una función citoprotectora. Apoyan esta idea experimentos con células sometidas a transfección, que expresaban grandes cantidades de PAI-2 y además eran resistentes a la citólisis inducida por el factor de necrosis tumoral (*TNF*) (Kumar S y Baglioni C, 1991). Los bajos niveles de PAI-2 detectados en el retraso de crecimiento intrauterino suponen una reducción de su papel citoprotector, y podrían contribuir a la reducción del transporte de nutrientes hacia el feto (Grancha S y col, 1996).

En síntesis, el papel del PAI-2 se ha relacionado con la protección celular frente a procesos proteolíticos relacionados con la muerte celular programada o apoptosis. Queda por determinar su función en compartimentos como el peritoneal, donde existe un considerable componente celular monocitario con capacidad para sintetizar PAI-2.

#### 1. 2. 4. 3. **Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3 (PAI-3)**

El PAI-3 se identificó en el plasma y la orina humana como una glicoproteína que inhibía a la uPA (Stump DC y col, 1986a). Tras comprobar que era inmunológica y funcionalmente idéntica a uno de los inhibidores de la proteína C activada (PCI), fue inicialmente caracterizada por Suzuki y col (1983) y posteriormente completada por Heeb y col (1987) y España y col (1989 a, b y c).

Estudios *in vivo*, han encontrado complejos de PAI-3 con uPA y tPA en orina y semen (España F y col, 1991, 1993a y 1999), y durante la terapéutica trombolítica con uPA (Geiger M y col, 1989) y tPA (España F y col, 1993b) también en pacientes con infarto de miocardio. Se han descrito niveles reducidos de PAI-3 en la enfermedad hepática, coagulación intravascular diseminada, así como en pacientes anticoagulados con heparina (Tabernero MD y col, 1990). A pesar de que la concentración plasmática de PAI-3 es considerablemente mayor que la de otros PAIs, su actividad inhibitoria sobre el sistema fibrinolítico en plasma es inferior. Sin embargo, la posible implicación de este inhibidor en el remodelado de la matriz extracelular o en los procesos de invasión tisular no ha sido todavía objeto de estudio.

## 1. 2. 5. CAMBIOS FIBRINOLÍTICOS EN LA ENDOMETRIOSIS

### 1. 2. 5. 1. Tejido endometrial eutópico

El endometrio humano es un tejido dinámico que sufre modificaciones periódicas durante el ciclo menstrual. Este tejido responde cíclicamente al estímulo estrogénico con una proliferación y al estímulo de progesterona con una diferenciación. Estos cambios ocurren también en el endometrio de localización eutópica intrauterina de las mujeres con endometriosis. La progesterona, además de inducir una diferenciación, inhibe la proliferación endometrial dependiente de estrógeno (Kirkland J y col, 1992). La estimulación *in vitro* de las células estromales con progesterona reduce la liberación y la activación de las metaloproteasas matriciales (Marbaix E y col, 1992) y aumenta la síntesis de componentes como el colágeno, la laminina, y la fibronectina (Farrar J y Carson D, 1992; Zhu H y col, 1992). Por todo ello, debido a una combinación de síntesis aumentada y degradación disminuida., la matriz extracelular en la fase secretora se consolida.

Se han descrito modificaciones en la expresión de uPA en función de la fase del ciclo menstrual, en particular, un aumento de la actividad fibrinolítica durante la menstruación (Casslen B y col, 1983; 1986; 1992 a y b). Posteriormente este hecho se ha comprobado tanto en el endometrio eutópico como en el tejido endometriósico de las mujeres afectas de endometriosis (Kobayashi H, 2000).

El sistema fibrinolítico sufre variaciones en función de estado hormonal de la paciente, por lo que cualquier tratamiento con esteroides debe ser tomado en consideración. El tratamiento con estradiol y progesterona en cultivos de células estromales endometriales aumenta el número de receptores celulares de superficie para la uPA (Casslen B y col, 1995b; Marbaix E y col, 1996). Además, la progesterona induce un aumento de la liberación de PAI-1 lo que determina la formación de una mayor cantidad de complejos uPA:PAI-1. La eliminación y degradación de estos complejos de la superficie celular es más eficiente que la de la uPA libre. La combinación de un mayor número de receptores de superficie y la disminución de la uPA libre podría explicar la reducción de la actividad plasmínica

en un ambiente con influjo estroprogestativo. Aunque el PAI-1 es también inhibidor del tPA, la concentración de este último no sufre las variaciones evidenciadas para la uPA por la acción de la progesterona. A pesar de esto, se ha comprobado que los niveles de tPA aumentan premenstrualmente, posiblemente en relación con el aclaramiento de la fibrina formada (Rybo G, 1966; Casslen B y col, 1981; Koh SC y col, 1992).

Los factores de crecimiento y las citoquinas pueden modular la concentración de los activadores e inhibidores del plasminógeno (Laiho M y col, 1989). El factor de crecimiento epidérmico (*EGF*) aumenta la concentración de uPA (Niedbala MJ y col, 1989), mientras que el factor de crecimiento transformante beta (*TGF- $\beta$* ) aumenta la concentración de PAI-1 y produce un efecto inhibidor del crecimiento de las células epiteliales (Laiho M y col, 1989). Sin embargo, a pesar de los múltiples mecanismos de regulación paracrina de la actividad plasmínica, los determinantes finales de dicha actividad son los activadores e inhibidores de activadores del plasminógeno. Los activadores del plasminógeno se encuentran dentro del endometrio en localizaciones más específicas que el plasminógeno. Se ha comprobado que el tPA se expresa en el endotelio vascular del endometrio, mientras que el scu-PA está además presente en las membranas basales del epitelio glandular y de superficie (Irigoyen JP y col, 1999).

Aunque la actividad de plasmina extraída del tejido endometrial es debida fundamentalmente al tPA, los medios de cultivos de células endometriales contienen casi exclusivamente uPA con mínimas cantidades de tPA (Casslen B y Astedt B, 1983). Este hecho puede explicarse por el almacenamiento de la uPA en las células endometriales en forma de precursor inactivo, la scu-PA, que puede no ser detectada por todas las técnicas disponibles (Kasai S y col, 1985). Estudios en cultivos celulares han mostrado que la uPA está localizada en lugares de unión al sustrato y en los puntos de anclaje intercelular, de ahí su importancia para el proceso de migración e invasión celular (Hebert CA y Baker JB, 1988; Pollanen J y col, 1988). Así pues, para determinar los niveles totales de uPA sería importante utilizar técnicas que permitieran la extracción completa de la proteína de la fracción citosólica y de membrana en el tejido estudiado.

### 1. 2. 5. 2. Tejido endometriósico

La disponibilidad de plasminógeno es esencial para que la plasmina ejerza su efecto de remodelado tisular y active las prometaloproteasas. Existen niveles elevados de plasminógeno en las células endometriales y en la matriz extracelular tanto del tejido uterino como del endometrio ectópico de las mujeres con endometriosis que sugiere un potencial elevado para la proteólisis extracelular. Por el contrario, la expresión de plasminógeno es débil en el estroma de los tejidos ovárico y peritoneal en los que se ha implantado endometrio ectópico (Finlay TH y col, 1983).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica no se han detectado cambios en la expresión del PAI-1 y PAI-2 en el endometrio ectópico y eutópico en fase proliferativa o secretora (Feinberg RF y col, 1989; Fernández-Shaw S y col, 1995). Tampoco se han encontrado diferencias significativas en el patrón de tinción del plasminógeno, uPA o tPA en función del momento del ciclo. La incapacidad para detectar estos cambios por inmunohistoquímica puede deberse, bien a una baja sensibilidad de los anticuerpos utilizados, o bien a la falta de almacenamiento de los PAIs en las células endometriales. Por otra parte, estos medios presentan el inconveniente de no poder realizar una cuantificación precisa de los niveles proteicos reales en el tejido.

Casslen y col (1995b) observaron un efecto negativo de la progesterona en la expresión de activadores del plasminógeno, debido al aumento de la expresión de PAI-1 y de uPAR en la superficie celular. La formación de complejos uPA:PAI-1 y su unión al receptor facilita el aclaramiento de plasmina activa. Estudios *in vitro* no han encontrado diferencias en los niveles de uPA, PAI-1 y PAI-2 en endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis aunque sí han evidenciado un aumento de la expresión de PAI-1 en presencia de progesterona (Gleeson N y col, 1993; Sillem M y col, 1997) y un aumento de la secreción de su-PAR en las células endometriales de las mujeres con endometriosis (Sillem M y col, 1997). Se ha argumentado que este último hallazgo podría aumentar la disponibilidad local de uPA mediante el enlentecimiento de su inhibición por el PAI-1 (Sillem M y col, 1997).

La cuantificación proteica, mediante técnicas de ELISA, ha evidenciado una mayor concentración de uPA y PAI-1 en endometrio de mujeres con endometriosis que en el endometrio de controles. Estos niveles son todavía mayores al estudiar muestras de tejido endometriósico (Bruse C y col, 1998). La mayor concentración de uPA en el endometrio de mujeres con endometriosis podría llevar a una anormal degradación del tejido endometrial durante la menstruación. De esta manera, se originarían fragmentos de tejido endometrial con un potencial mayor para degradar la matriz extracelular que en la mujer sana, lo que facilitaría su implantación (Wild RA y col, 1994; Evers JL y col, 1995). Sin embargo, los niveles de uPA en cultivos de células endometriales estromales son menores en el tejido eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis y su expresión se mantiene estable en el tiempo (Guan YM y col, 2002). Este hecho podría explicarse por la ausencia de factores reguladores *in vitro*, como es el caso de la progesterona.

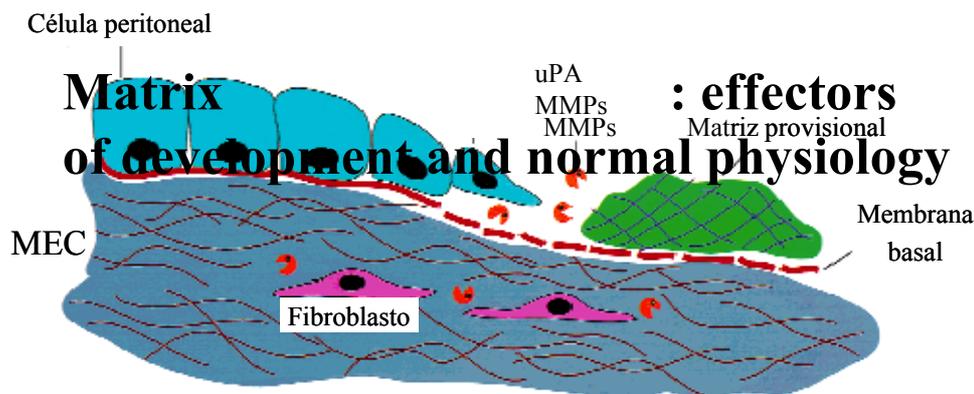
Existe evidencia de que la endometriosis es una enfermedad estrógeno-dependiente, pero los datos sobre el efecto de los estrógenos en la producción de uPA, uPAR y PAI-1 son conflictivos. La expresión de uPA está aumentada en la fase proliferativa en el tejido adenomiótico (Kobayashi H, 2000). Sin embargo, el cultivo de células endometriales estromales *in vitro* con dietilestilbestrol no produce cambios significativos en los niveles de uPA, PAI-1 o uPAR (Sillem M y col, 1997).

Por el contrario, otros autores han sugerido que el tejido endometriósico no es tan estrógeno-dependiente como el endometrio normal, quizás como consecuencia de un defecto en el metabolismo esteroideo (Carlstrom K y col, 1988; Bergqvist A y col, 1993). La expresión de aromatasa es aberrante en el tejido endometriósico y existe una deficiencia en 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que produce un aumento de la concentración tisular de estradiol (Zeitoun KM y col, 1999; Bulum SE y col, 2000). Estudios en animales han demostrado que el estradiol no es necesario para el proceso de implantación (Bergqvist A y col, 1985; Rock JA y col, 1993). Sin embargo, sería determinante en la proliferación y crecimiento del tejido endometriósico (Dizerega GS y col, 1980).

### 1. 2. 5. 3. Líquido peritoneal

El tejido peritoneal lesionado contiene depósitos de fibrina en superficie, exudado de células blancas y tejido mesotelial necrótico. Cuando la fibrina es degradada por el sistema fibrinolítico, el peritoneo se repara sin dar lugar a la formación de adherencias. Sin embargo, en presencia de residuos de fibrina debidos a un nivel inicial excesivo o una actividad fibrinolítica disminuida, se puede comprobar una activación de fibroblastos con producción de fibrosis y adherencias intraabdominales (Buckman RF y col, 1976). Existe una amplia variedad de células en la cavidad peritoneal capaces de expresar componentes del sistema fibrinolítico (Herrick S y col, 1999; Lijnen HR, 2001). Los macrófagos producen tPA, PAI-1 y sus receptores, pero el mayor contribuyente a la actividad fibrinolítica del abdomen son las células mesoteliales (Topley N y col, 1996; Holmdahl L y col, 1999). Estas células expresan fundamentalmente activadores fibrinolíticos y por ello son cruciales para el mantenimiento de la integridad peritoneal.

La barrera peritoneal sufre un proceso de remodelado muy similar al de la herida del tejido cutáneo (*Figura 1. 12*). Diversos estudios en deficiencias de uPAR y tPA han demostrado que el déficit de uPAR:tPA produce una alteración del proceso de cicatrización menos severa que el déficit de uPA:tPA (Bugge TH y col, 1996). Estos trabajos sugieren que la uPA es por sí misma suficiente para eliminar los depósitos de fibrina y permitir el proceso de cicatrización. Por otra parte, el déficit de plasminógeno causa un retraso en el proceso de cicatrización debido tanto a una alteración en la migración de los queratinocitos como a un déficit de angiogénesis. Además, el trauma tisular y la isquemia aumentan la formación de adherencias, ya que inducen una reducción de la actividad fibrinolítica peritoneal. Este efecto es debido fundamentalmente a una disminución en los niveles de tPA y a un aumento del PAI-1 en el líquido peritoneal y puede observarse también en procesos inflamatorios peritoneales o tras una intervención quirúrgica sobre el abdomen (Topley N y col, 1996; Holmdahl L y col, 1998). Por otra parte, la administración intraoperatoria de tPA ha demostrado ser capaz de prevenir la formación de adherencias, sin interferir con el proceso de cicatrización peritoneal (Evans DM y col, 1993; Tsuji K y col, 1996; Lai HS y col, 1998).



**Figura 1. 12. Mecanismo de regeneración peritoneal.** El modelo de regeneración cutánea tras una herida traumática se podría aplicar básicamente al proceso de reparación peritoneal tras sufrir una agresión externa (MEC: matriz extracelular; MMPs: metaloproteasas matriciales; uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa).

El hallazgo de niveles de tPA y uPA aumentados en el líquido peritoneal en mujeres con endometriosis o adherencias peritoneales establecidas podría sugerir una activación secundaria del sistema fibrinolítico para limitar la formación de nuevas adherencias (Edelstam G y col, 1998). La administración intraperitoneal de anticuerpos anti PAI-1 ha demostrado reducir la incidencia de adherencias tras una lesión quirúrgica del peritoneo, probablemente por limitar la disponibilidad de PAI-1 para la inhibición del tPA (Falk K y col, 2001).

Existen resultados conflictivos en la literatura en relación a la actividad fibrinolítica en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (Duselman GA y col, 1988). Algunos autores han descrito una actividad del activador del plasminógeno en el líquido peritoneal similar en pacientes con o sin endometriosis (Batzofin JH y col, 1985). Sin embargo, Astedt y Nordenskjold (1984) encontraron un aumento en los niveles de activadores del plasminógeno en el líquido peritoneal de las mujeres con esta enfermedad.

Al estudiar los inhibidores fibrinolíticos en el líquido peritoneal se observan resultados diversos que varían en función de la técnica utilizada y el estadio de la enfermedad. Bruse y col (1998) encontraron una mayor concentración de PAI-2 en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis al compararlas con los controles libres de enfermedad. Estos resultados podrían explicarse por la existencia de una mayor actividad de los macrófagos peritoneales en las mujeres con endometriosis que serían responsables del aumento de la secreción de PAI-2 al medio peritoneal. Por el contrario, cuando se estudian exclusivamente los estadios iniciales de la enfermedad, con presencia de implantes peritoneales pero sin síndrome adherencial asociado, se evidencia una disminución de los niveles de PAI-2 en líquido peritoneal (Bruse C y col, 1998). Además, los niveles de PAI-2 antigénico aumentan tras la liberación quirúrgica de las adherencias (Edelstam G y col, 1998).

En síntesis, el aumento del nivel de uPA en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis sugiere que el sistema fibrinolítico se activa secundariamente para limitar la neoformación de adherencias.

Aunque se han realizado numerosos estudios implicando el sistema fibrinolítico con la endometriosis quedan por definir los cambios específicos de cada componente del mismo en los diferentes estadios evolutivos de la enfermedad.

### **1.3. ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA DE LAS METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR**

#### **1.3.1. LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)**

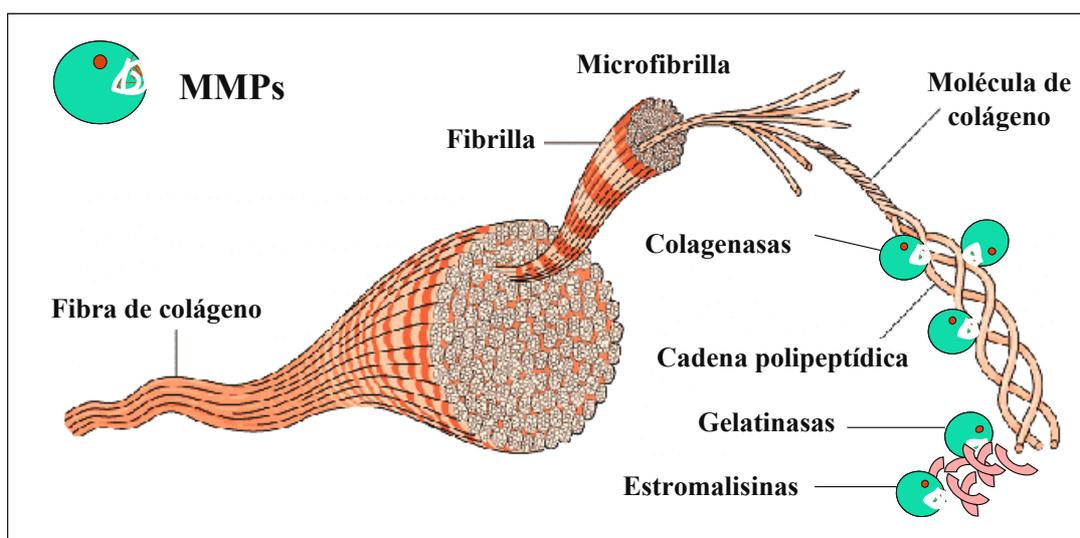
La matriz extracelular (MEC) es una compleja estructura glicoproteica que sirve de soporte celular y confiere una ultraestructura tridimensional específica a cada tejido. Además de su función estructural, la MEC funciona como un medio para el intercambio de señales celulares que modulan procesos tan diferentes como la angiogénesis, la proliferación y migración celular, las respuestas inflamatorias e inmunológicas y los procesos de reparación tisular (Bissell MJ y col, 1982; Ingber D y col, 1991).

La composición de esta matriz no es estática. Existe un proceso de regeneración continua en el que participa un complejo sistema de enzimas con una regulación específica. El descubrimiento de citoquinas, factores de crecimiento y de potentes proteínas funcionales que se expresan en el seno de la MEC, nos hace comprender la relevancia de la misma en el proceso de comunicación intercelular. A su vez, la regulación paracrina descrita por algunos autores resulta fundamental para la correcta homeostasis de cada uno de los tejidos de nuestro organismo (Martins-Green M y col, 1995; Bonewald LF y col, 1999).

El colágeno, del que se han identificado más de 20 tipos diferentes, es la proteína más abundante en la MEC. La estructura tisular en los mamíferos está compuesta fundamentalmente por colágeno tipo I, que ha mantenido una secuencia de aminoácidos constante a lo largo del proceso evolutivo (Van der Rest M y Garrone R, 1991). Aunque los otros tipos de colágeno están presentes en menor cantidad, son éstos los que confieren a la MEC las propiedades mecánicas y estructurales que permiten el proceso de reparación tisular.

La fibronectina representa un importante componente de la MEC, tan solo superada cuantitativamente por el colágeno. Existe una isoforma soluble y otra tisular que aporta numerosos ligandos para la adhesión de múltiples tipos celulares. Esta proteína se expresa fundamentalmente en las estructuras submucosas y en la membrana basal (Miyamoto S y col, 1998; Schwarzbauer JE y col, 1991 y 1999).

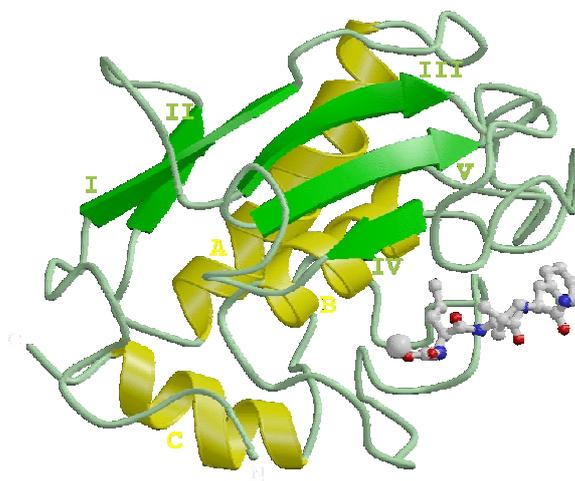
La laminina es una compleja proteína de adhesión que se encuentra en el seno de la MEC, sobre todo a nivel de la membrana basal. Su principal función consiste en la formación y el mantenimiento de las estructuras vasculares de los tejidos. Los fenómenos de reparación tisular que ocurren en el seno de la MEC están limitados por el establecimiento de una vascularización adecuada, proceso en el que la laminina juega un papel fundamental (Ponce M y col, 1999; Werb Z y col, 1999).



**Figura 1. 13. Estructura de colágeno humano.** El colágeno es el componente más abundante de la matriz extracelular. Las metaloproteasas matriciales (MMPs) tipo colagenasa, son capaces de actuar sobre la triple hélice helicoidal de la fibra de colágeno y degradarla. Los productos resultantes de la acción de las colagenasas se desnaturalizan rápidamente en gelatina, la cual es a su vez susceptible de la acción de otras MMPs, como las gelatinasas y las estromalisinas.

### 1. 3. 2. LAS METALOPROTEASAS MATRICIALES (MMPs)

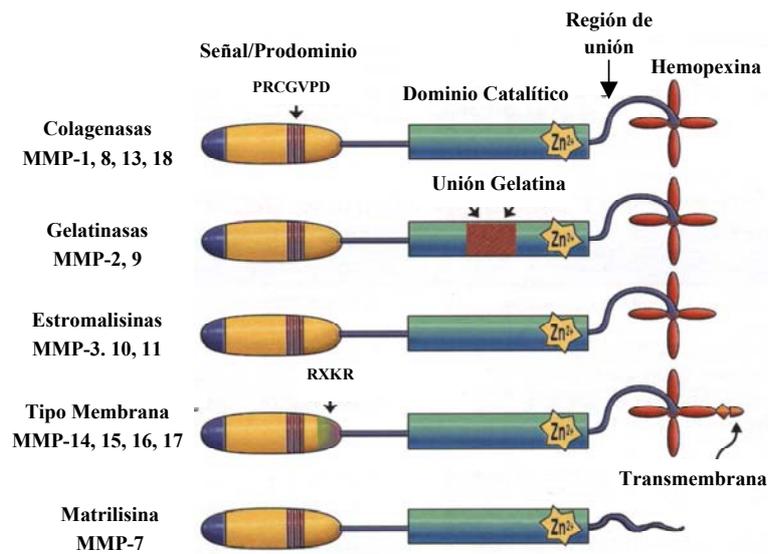
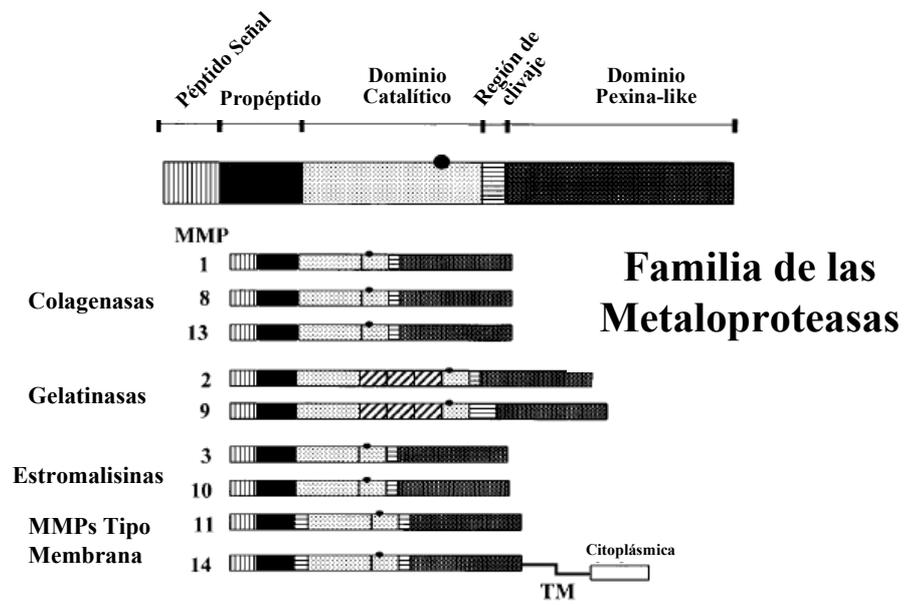
La correcta homeostasis de la MEC está regulada por la existencia de un tipo de enzimas proteolíticas conocidas como las metaloproteasas matriciales (MMPs). La asociación de estas MMPs con sus inhibidores se denomina sistema de las MMPs. Este sistema controla el correcto recambio del tejido conectivo en todo el organismo al participar en procesos fisiológicos fundamentales, como son la implantación del blastocisto, el desarrollo embrionario, el crecimiento óseo y la reparación de los tejidos dañados (Matrisian LM, 1990; Woessner JF, 1991; Waterhouse P y col, 1993). También se ha postulado su control sobre los cambios cíclicos que ocurren a nivel del tracto genital femenino. Su actividad, regulada paracrinamente por hormonas, factores de crecimiento y citoquinas, determina la función de tejidos como el endometrio y el ovario. Sin embargo, en condiciones patológicas en las que se desarrolla un proceso de invasión tisular como es el caso del cáncer o la endometriosis, se observa una pérdida del delicado control de este sistema (Spuijbroek MD y col, 1992; Castelló R y col, 2002; Gottschalk C y col, 2000).



*Figura 1. 14. Estructura de la MMP-3. Representación tridimensional del dominio catalítico del complejo de la estromalisina humana con un inhibidor hidrofóbico (Van Doren SR y col, 1995)*

Las MMPs forman una familia de enzimas zinc-dependientes capaces de degradar colectivamente la mayoría de las proteínas de la MEC a un pH neutro (*Tabla 1. 1*) (Nagase H y Woessner JF, 1999; Murphy G y col, 1999). Todas ellas comparten características estructurales y funcionales semejantes (*Figura 1. 15*), entre las que se incluyen: 1) secreción como proenzimas inactivas (pro-MMPs), 2) activación posterior en el espacio extracelular con un sitio de unión al zinc, 3) reconocimiento por un dominio catalítico común o péptido señal, y 4) inhibición de la acción de la MMP a nivel extracelular por medio de inhibidores específicos (Bikedal-Hansen H y col, 1993; Curry TE y col, 2001).

A pesar de sus semejanzas estructurales, las MMPs presentan diferencias en el reconocimiento y especificidad sobre los diversos componentes de la MEC (*Tabla 1. 1*). Las colagenasas son capaces de degradar los distintos tipos de colágeno (Kleinert DE y col, 1993). Su acción sobre el colágeno fibrilar deshace su estructura helicoidal con el consiguiente cambio en su estabilidad inicial (*Figura 1. 13*). Los productos resultantes de la actuación de la colagenasa se desnaturalizan rápidamente en gelatina, que a su vez es sustrato de otras enzimas, como las gelatinasas y las estromalinas. Ambas enzimas tienen la capacidad de degradar los constituyentes principales de las membranas basales, como el colágeno tipo IV, la laminina y la fibronectina. Las estromalinas poseen además actividad sobre un amplio grupo de sustratos diferentes de la MEC y ejercen su actividad enzimática sobre otras MMPs, factores de crecimiento, y citoquinas. Esta actividad permite a las MMPs regular el crecimiento tisular, no sólo por limitar las interacciones entre la MEC y la célula, sino también por regular la biodisponibilidad de factores de crecimiento en la misma. Las MMPs de tipo membrana (MT-MMPs) contienen un dominio transmembrana en la porción carboxi-terminal que las une a la membrana plasmática y otro dominio extracelular en contacto con la superficie de la célula. La función principal de este tipo de MMPs es regular la activación de la MMP-2.



**Figura 1. 15. Estructura de las metaloproteasas humanas.** Las metaloproteasas matriciales humanas (MMPs) contienen un péptido señal, un dominio propeptídico que debe clivarse para su activación, un dominio catalítico que contiene el sitio de unión al zinc, y un dominio hemopexina-like. Las MMPs de tipo membrana (MT-MMPs) contienen un dominio transmembrana (TM) además del dominio citoplasmático (Alexander P, 2002).

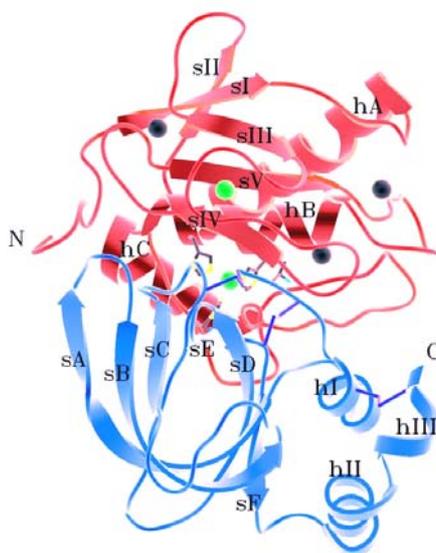
	MMP nº.	Otros nombres	Localización de la proteína <sup>a</sup>	Colágeno	Sustratos adicionales
<b>Colagenasas</b>	1	Colagenasa intersticial Colagenasa-1	Estroma (focal)	I,II,III,VII, VIII,X	Agrecano;gelatina;MMPs 2,9
	8	PMNL-colagenasa Colagenasa-2		I,II,III,V,VI I,VIII,X	Agrecano;elastina;fibronectina gelatina;laminina
	13	Colagenasa-3		I,II,III,IV	Agrecano;gelatina
<b>Gelatinasas</b>	2	Gelatinasa A Gelatinasa 72kDa	Estroma, endotelio	I,II,III,IV,V ,VII,X,XI	Agrecano;elastina;fibronectina gelatina;laminina;MMPs 9,13
	9	Gelatinasa B Gelatinasa 92 kDa	NT, M, Eo	IV,V,VII,X ,XIV	Agrecano;elastina;fibronectina gelatina
<b>Estromalisinas</b>	3	Estromalisina-1 Procolagenasa Transina 1	Estroma (focal)	II,III,IV,IX, X,XI	Agrecano;elastina;fibronectina gelatina;laminina;tenascina-C; vitronectina;MMP s 7,8,13
	7	Matrilisina PUMP-1	Epitelio glandular	IV,X	Agrecano;elastina;fibronectina gelatina;laminina;IGFBP-1; MMPs 1,2,9
	10	Estromalisina-2 Transina-2		II,IV,V	Agrecano;elastina;fibronectina gelatina;laminina;MMPs 1,8
	11	Estromalisina-3		II,IV,V	Agrecano, fibronectina, laminina
<b>MMPs de tipo-membrana</b>	12	Metaloelastasa			Elastina;fibronectina;gelatina; laminina
	14	MT-1-MMP		I,II,III,IV	Agrecano;elastina;fibronectina gelatina;laminina;MMPs 2,13
	15	MT-2-MMP			Fibronectina;gelatina;MMP-2
	16	MT-3-MMP			MMP-2
	17	MT-4-MMP			Fibrina W9ULZ9
	24	MT-5-MMP			MMP-2
<b>Otras</b>	25	MT-6-MMP			MMP-2
	19	RASI-1			Agrecano
	20	Enamalisina			Amelogenina
	23	Estromalisina-4			
	26	Matrilisina-2 Endometasa			Gelatina; fibronectina

<sup>a</sup> Datos de estudio de hibridación e inmunohistoquímica. *RASI: Rheumatoid Arthritis Synovial Inflammation*; NT: neutrófilos, M: macrófagos, Eo: eosinófilos.

**Tabla 1. 1. Clasificación de las metaloproteasas matriciales humanas (MMPs).** Las diferentes MMPs se clasifican en cada subfamilia en función del sustrato sobre el que actúan (Nagase H, 1997).

### 1. 3. 3. INHIBIDORES TISULARES DE LAS METALOPROTEASAS (TIMPs)

La actividad de las MMPs en el espacio extracelular está controlada rigurosamente por un sistema de inhibidores que se divide, según su origen, en inhibidores serológicos e inhibidores tisulares (TIMPs) (*Tabla 1. 2*) (Gómez DE y col, 1997; Brew y col, 2000). Los inhibidores serológicos actúan sobre un amplio espectro de proteasas e incluyen macroglobulinas, como la  $\alpha 2$ -macroglobulina, los inhibidores del activador del plasminógeno (PAIs) y el  $\alpha 1$ -inhibidor. El segundo grupo de inhibidores se produce localmente e inhibe específicamente las MMPs a nivel tisular. En la última década se constata en la literatura un número creciente de estudios sobre los TIMPs, pues al tener una importante expresión tisular y ser regulados hormonalmente podrían desempeñar un papel fundamental en numerosos procesos de los tejidos reproductivos de la mujer (Woessner JF, 1991; Rodgers WH y col, 1994; Salamonsen LA y Woolley DE, 1996).



*Figura 1. 16.. Modelo estructural de la conformación de la molécula del TIMP-1. Estructura tridimensional de un complejo del dominio N-terminal del TIMP-1 con el dominio catalítico de la MMP-3 (Gomis-Rüth FX, 1997).*

La familia de los TIMPs incluye 4 proteínas, TIMP 1- 4, que comparten una secuencia peptídica idéntica y actúan formando complejos 1:1 con las MMPs (Douglas DA y col, 1997). Aunque los TIMPs no parecen diferenciar las MMPs sobre las que actúan, se ha observado un cierto grado de especificidad. Por ejemplo, el TIMP-1 se fija preferentemente a las colagenasas y las MMPs -3 y -9 (*Figura 1. 16*), mientras que el TIMP-2 tiene una alta afinidad por la MMP-2. Sabemos que los TIMPs -1 y -2 difunden en el medio extracelular, mientras que el TIMP-3 está ligado a los constituyentes de la MEC, por lo que actuaría impidiendo la fijación de las MMPs a su sustrato (Pavloff N y col, 1992; Leco KJ y col, 1994). Recientemente se ha clonado el TIMP-4, molécula que posee una especificidad de sustrato similar a la del TIMP-2 (Gómez DE y col, 1997; Leco KJ y col, 1997; Brew K y col, 2000).

Los TIMPs son proteínas multifuncionales cuya acción no se limita exclusivamente a la inhibición de las MMPs ya que también intervienen en la regulación de numerosos factores de crecimiento que determinan el desarrollo tisular (Gómez DE y col, 1997). Además, los TIMPs promueven el desarrollo embrionario (Sato T y col, 1994), actúan como factores antiangiogénicos (Murphy G y col, 1999), estimulan el crecimiento celular (Hayakawa T y col, 1992) y modulan la apoptosis (Talhok RS y col, 1992). Así pues, actúan como factores paracrinos en los procesos reproductivos y matizan la proliferación y diferenciación celular, así como la neovascularización tisular.

TIMP	Otros nombres	Localización de la proteína <sup>a</sup>	MMPs que son sustrato
TIMP-1	Inhibidor de MMPs tipo 1 Potenciador actividad eritroide Inhibidor fibroblástico colagenasa	Epitelio, estroma, músculo liso vascular	MMP1,2,3,7,8,9,10,11,12,13,16
TIMP-2	Inhibidor de MMPs tipo 2 CSC-21K	Epitelio, estroma, músculo liso vascular	MMP1,2,3,7,8,9,10,13,14,15,16,19
TIMP-3	Inhibidor de MMPs tipo 3 Proteína MIG-5	Epitelio, estroma, músculo liso vascular	MMP-1,2,3,7,9,13,14,15
TIMP-4	Inhibidor de MMPs tipo 4		MMP-1,2,3,7,9

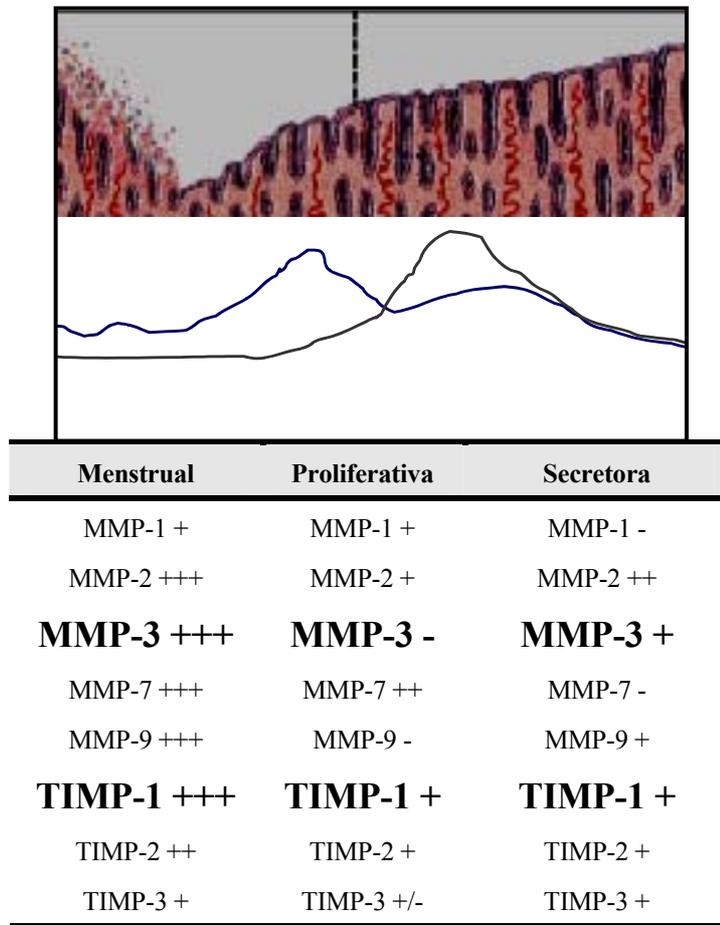
<sup>a</sup> Datos de estudio de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

**Tabla 1. 2. Clasificación de las inhibidores titulares de las MMPs (TIMPs).** Los TIMPs producen una inhibición específica de las MMPs a nivel tisular (CSC-21 K: cisteina-serina-cisteina 21K; MIG-5:gen 5 inducible por mitógeno) (Adaptado de Nagase H, 1997 y Salmonsén LA, 1999a).

### 1. 3. 4. PAPEL DE LAS MMPs EN LA MENSTRUACIÓN

La menstruación es la culminación de los cambios en la arquitectura vascular y celular del endometrio que ocurren tras la caída de los esteroides sexuales. Al final de la fase secretora se produce un edema del estroma y una rotura de la membrana basal capilar secundaria a una disminución del contacto pericito-endotelial tras vasodilatación (Roberts DK y col, 1992). Al mismo tiempo, se produce un influjo de células inflamatorias que segregan numerosas citoquinas al medio extracelular (Salamonsen LA, 1999b). A continuación, aumenta la liberación de agentes vasoconstrictores, como endotelinas y prostaglandinas, que estimulan a su vez la contractilidad miometrial. Como resultado de este proceso el estrato funcional del endometrio sufre una necrosis que conlleva su fragmentación y liberación a la cavidad uterina (Markee JE y col, 1940; Baird DT y col, 1996; Jones RL y col, 1997; Campbell S y Cameron IT, 1998).

Recientemente, un número importante de estudios han implicado al sistema de las MMPs y sus inhibidores en el mecanismo íntimo por el que los procesos anteriormente descritos tienen lugar (Dong JC y col, 2002). Mediante inmunohistoquímica (Martelli M y col, 1993; Rodgers WH y col, 1993) e hibridación *in situ* (Hampton AL y Salamonsen LA, 1994; Rodgers WH y col, 1994) se ha evidenciado la producción de MMP-1, -2, -3, -7 y -9 en el tejido endometrial, así como de TIMP-1 y -2. Estudios *in vivo* han demostrado la existencia de cambios cíclicos en la expresión del mRNA de diferentes MMPs (*Figura 1. 17*). Algunas MMPs, como las MMP- 2, -7 y -11, se expresan en la fase proliferativa o secretora, mientras que otras como la MMP-1 y -3 se identifican fundamentalmente en la fase menstrual y podrían estar implicadas directamente en el inicio de la menstruación (Hampton AL y Salamonsen LA, 1994). Se ha constatado la expresión de TIMP-1 y -2 en las células estromales endometriales durante todo el ciclo menstrual. Dicha expresión aumenta, aunque en menor medida que las MMPs, los días 1 y 2 del ciclo. Dado que la inactivación de MMPs se produce mediante la formación de complejos 1:1 con los TIMPs, existe en ese periodo una tendencia a la proteólisis tisular que facilitaría la degradación del endometrio (Salamonsen LA y col, 1997).



**Figura 1. 17. Cambios cíclicos en las metaloproteasas en el endometrio humano.** El aumento de los niveles de MMP-3 durante la menstruación se localiza con inmunohistoquímica en los vasos de los estratos superficiales del endometrio. Más tarde, el incremento en la síntesis de TIMP-1 podría limitar el proceso proteolítico a los estratos superficiales del tejido endometrial. (Rodgers WH, 1994; Freitas S y col, 1999). MMPs: metaloproteasas matriciales; TIMPs: inhibidores titulares de las MMPs.

La mayor parte de las MMPs son producidas por las células del estroma durante la menstruación (Rawdanowicz TJ y col, 1994; Rodgers WH y col, 1994). Sin embargo, estudios *in vivo* e *in vitro* han constatado la capacidad de liberar MMPs por parte de las células endometriales epiteliales y estromales cultivadas por separado (Martelli M y col, 1993). Mediante inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia de MMP-2, -3 y -9 en las estructuras vasculares endometriales (Freitas S y col, 1999). Además, la expresión de la MMP-3 es mayor durante la fase premenstrual y menstrual a nivel de los vasos del estrato superficial endometrial, lo que le confiere un papel fundamental en el inicio de la menstruación. La expresión de la MMP-7 también aumenta durante la menstruación y es la única MMP que se expresa focalmente en el epitelio glandular, sin que hasta el momento se haya detectado a nivel estromal o vascular (Rodgers WH y col, 1993).

Los esteroides ováricos son necesarios en el funcionamiento de numerosos tejidos, como es el caso del endometrio (Cano A y col, 1986; Salom JB y col, 2001). Los cultivos de células endometriales a los que se les retiran los esteroides, liberan importantes cantidades de MMPs que se activan rápidamente (Marbaix E y col, 1992). Experimentos *in vivo* evidencian la expresión de MMP-11 al día siguiente de la privación hormonal y de las MMPs -1, -3, -7 y -10 dos días después de la misma. Los niveles de MMPs -1, -3 y -10 disminuyen considerablemente de dos a tres días más tarde, mientras que los de las MMPs -7 y -11 se mantienen hasta seis días después de la caída de la concentración de progesterona, lo que reproduce exactamente el tipo de expresión observada en el ser humano.

La regeneración endometrial comienza el segundo día del inicio del sangrado menstrual (Smith SK y col, 2001). La expresión heterogénea de TIMP-1 y -2 en las células musculares arteriolas y en el estroma durante la menstruación limita la acción de las MMPs en algunas zonas y preserva así la capacidad de regeneración endometrial (Freitas S y col, 1999). En otras zonas, la persistencia de la actividad plasmínica y de las MMPs permitiría disolver la barrera de fibrina formada tras la descamación endometrial y favorecería así la migración celular y la regeneración a partir del estrato basal endometrial (Salo T y col, 1994).

La angiogénesis es un proceso fundamental para la reparación endometrial (Folkman J, 1997). El factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) es el principal factor angiogénico endometrial, y está controlado por los esteroides ováricos. Durante la menstruación se produce un incremento de su actividad que induce la expresión de MMPs e inhibe la actividad de los TIMPs en las células endoteliales (Lamoreaux WJ y col, 1998). Se ha demostrado que la acción de la MMP-2 y -9 es importante en las etapas iniciales de formación capilar (Salamonsen LA y Woolley DE, 1996). La MMP-1, por su parte, es responsable de la migración celular endotelial por la matriz extracelular. Los niveles de TIMP-1, -2 y -3 permanecen bajos durante la fase proliferativa del ciclo menstrual y se expresan en respuesta al aumento de los niveles de progesterona (Rodgers WH y col, 1994; Maatta M y col, 2000). El aumento de TIMP-1, -2, -3 y posiblemente de TIMP -4, inhibe el proceso de neovascularización una vez se ha completado la regeneración tisular (Hiraoka N y col, 1998).

### 1.3.5. REGULACION PARACRINA

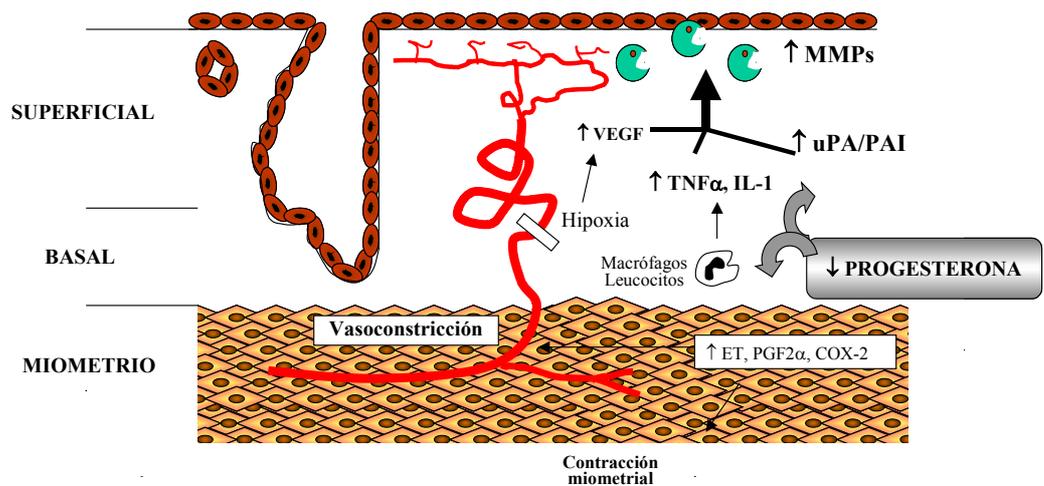
Además del sistema de los TIMPs existen numerosos factores hormonales y citoquinas que regulan paracrinamente la expresión y actividad del sistema de las MMPs (*Figura 1. 18*) (Bulteri C y col, 1998). Es importante conocer los mecanismos que controlan la expresión de las MMPs para comprender mejor la fisiología de la matriz extracelular.

Diversos autores han estudiado a los esteroides ováricos como parte de estos mecanismos de regulación (Curry TE y Osteen KG, 2001). Es poco probable que los niveles fisiológicos de estrógeno afecten directamente la actividad de las MMPs en tejidos del aparato reproductor femenino durante los periodos de crecimiento tisular (Osteen KG y col, 1994 y 1999; Schatz F y col, 1994; Rudolph-Owens L y col, 1998). Por el contrario, numerosos estudios *in vitro* han demostrado que concentraciones fisiológicas de progesterona producen una potente inhibición de la expresión proteica y de mRNA de diferentes MMPs, como la MMP-1, -2 y -9 (Marbaix E y col, 1992; Matrisian LM y col, 1994; Woessner JF, 1996; Huang HY y col, 1998; Singer C y col, 1999). Sin embargo, la exposición y la subsiguiente caída brusca de los niveles de progesterona induce la secreción y activación de ciertas MMPs (Martelli M y col, 1993; Hampton AL y Salamonsen LA, 1994; Rodgers WH y col, 1994; Lockwood CJ y col, 1998). El único estudio *in vivo* que analiza estos cambios en la menstruación (Rudolph-Owens L y col, 1998) encontró que la expresión de la mayoría de MMPs disminuye tras la misma en ausencia de progesterona. La expresión de la MMP-7 y el TIMP-1 pasa de la zona funcional a la basal tras la caída hormonal. Por lo tanto, es poco probable que la progesterona sea el único factor implicado en la regulación paracrina de las MMPs.

Los niveles de las MMPs en el tejido endometrial parecen estar también regulados por cambios en la celularidad local (James TW y col, 1993; Osteen KG y col, 1994). Así, durante la fase premenstrual el mayor número de células linfomieloides (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos) conlleva un aumento en la producción de citoquinas y proteasas (Salamonsen LA y Woolley DE, 1999a). También aumenta la activación de los mastocitos, que liberan potentes citoquinas,

como el *TNF- $\alpha$*  y la interleuquina-1 (*IL-1*). Tanto la *IL-1* como el *TNF- $\alpha$*  estimulan la producción de las proMMP-1, -3 y, en menor medida de la proMMP-2 (Zhang J y col, 1998; Bruner-Tran KL y col, 1999). Se ha demostrado en cultivos de endometrio humano que diversas citoquinas pueden inducir la expresión selectiva de ciertas MMPs (Singer C y col, 1999). Tal y como se ha comentado previamente, el *VEGF* es un potente factor angiogénico presente en el endometrio humano que se ha implicado en la modulación de las MMPs (Garrido N y col, 2001). Este factor estimula la expresión de MMP-1, -3 y -9 en células de músculo liso y de MMP-1 en células endoteliales (Wang H y Keiser JA, 1998). Además de existir citoquinas que aumentan su actividad, se han encontrado factores supresores de la expresión de MMPs. Tal es el caso del factor de crecimiento transformante - $\beta$  (*TGF- $\beta$* ), el ácido retinoico y los glucocorticoides (Bruner KL y col, 1995; Nagase H y Woessner JF, 1999; Oosterlinck DJ y col, 1994b).

Existen evidencias de la interrelación existente entre los sistemas de las MMPs y el sistema fibrinolítico. Diversos estudios en ratones transgénicos indican que la uPA, es un activador fundamental de las pro-MMPs (Carmeliet P y col, 1997). Estudios *in vitro* con células estromales de endometrio humano demostraron que los niveles de uPA son regulados directamente por cambios en la expresión del PAI-1 (Lockwood CJ y col, 1995; Schatz F y col, 1995). La actividad del PAI-1 determina, por tanto, una inhibición en la expresión de las MMPs independientemente de los niveles de TIMPs (Lockwood CJ y col, 1998). La plasmina, por su parte, es capaz de degradar directamente la matriz extracelular, pero también puede ejercer su efecto proteolítico mediante la activación de diversas pro-MMPs (Eeckhout Y y Vaes G, 1977). La interrelación existente a nivel endometrial entre el sistema fibrinolítico y de las MMPs hace necesario su estudio conjunto en situaciones patológicas, como es el caso de la endometriosis.



**Figura 1. 18. Regulación paracrina de las MMPs en el endometrio.** Existen diversos mecanismos implicados en el proceso de la menstruación. La hipoxia secundaria a vasoconstricción y la caída del nivel de progesterona estimula la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas. Éstas modulan la actividad de las proteasas, encargadas de degradar el sustrato superficial del endometrio (ET: endotelinas; PGDF- $\alpha$ 2: factor de crecimiento derivado de la plaqueta- $\alpha$ 2; COX-2: cicloxigenasa-2) (Modificado de Salamonsen LA, 1999b)

### 1. 3. 6. CAMBIOS EN LA ENDOMETRIOSIS

#### 1. 3. 6. 1. Líquido peritoneal

Los mecanismos patogénicos de la endometriosis no se comprenden todavía completamente. La hipótesis más aceptada consiste en el paso de restos de tejido endometrial a la cavidad peritoneal tras un proceso de menstruación retrógrada a través de las trompas. Una vez el tejido endometrial contacta con la superficie peritoneal se inicia un proceso de adhesión e invasión que lleva consigo la formación de nuevos vasos, y finalmente da lugar a la lesión endometriósica (Sampson JA, 1927 y 1940; Giudice LC y col, 1998). Sin embargo, la menstruación retrógrada se observa en la mayoría de las mujeres con ciclos menstruales y sólo algunas de ellas desarrollan lesiones de endometriosis. Por lo tanto, deben existir factores del tejido endometrial o del ambiente peritoneal en esas mujeres que las hace más susceptibles de padecer esta enfermedad. Algunos investigadores han propuesto la existencia de defectos peritoneales microscópicos que facilitan el contacto de los fragmentos de tejido endometrial con la matriz extracelular subperitoneal y facilitan los procesos de proliferación e invasión de la misma (Groothuis PG y col, 1999).

El líquido peritoneal no actúa como un reservorio pasivo de las células y factores secretados a la cavidad peritoneal, sino que participa activamente en el mantenimiento del ambiente peritoneal. El volumen de este líquido es variable y proviene de dos fuentes fundamentales: el trasudado plasmático y el exudado ovárico (Huang JC y col, 1996; Oral E y col, 1996). En la endometriosis existen cambios en el componente celular peritoneal asociados a un estado inflamatorio y de mayor inmunotolerancia que impide la degradación de los fragmentos endometriales (Maeda N y col, 2002). El aumento del número y la actividad de los macrófagos del líquido peritoneal en las mujeres con endometriosis conlleva un incremento en la síntesis de citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis y la proliferación de fibroblastos. De esta manera, se facilitaría la implantación de fragmentos endometriales y la formación de adherencias (Ho HN y col, 1997; Richter O y col, 1998; Senturk LM y Arici A, 1999; Mahnke JL y col, 2000; Mc Laren J y col, 2000). También existe un número mayor de células NK y linfocitos T en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis (Dmowski WP y col, 1994). Sin embargo, la actividad citotóxica de las células NK contra el endometrio autólogo está disminuida, de forma que su destrucción en la cavidad peritoneal es menor que en condiciones normales (Oosterlynck DJ y col, 1992).

Estas modificaciones del ambiente peritoneal se traducen en una alteración del equilibrio del sistema de las MMPs y consecuentemente un desbalance en la actividad proteolítica del líquido peritoneal. Los niveles totales de MMP-9 se encuentran aumentados en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis, mientras que la concentración de MMP-9 activa no varía (Szamatowicz J y col, 2002). Existen también variaciones de los niveles de inhibidores de las MMPs en el líquido peritoneal de estas pacientes (Sharpe-Timms KL y col, 1995). Por una parte, estudios *in vitro* han evidenciado que las lesiones peritoneales son capaces de sintetizar y secretar TIMP-1. Sin embargo, se han encontrado unos niveles proteicos de TIMP-1 menores en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (Sharpe-Timms KL y col, 1998a; Szamatowicz J y col, 2002). Una posible explicación a este hecho es que el TIMP-1 podría estar localizado selectivamente en las lesiones endometriósicas o en las células del tejido peritoneal, con una reducción de la secreción del mismo al medio peritoneal. Por otra parte, el tratamiento con

análogos de la GnRH en estas pacientes, produce una recuperación de los niveles normales de TIMP-1 (Sharpe-Timms y col, 1998a). Además, la adición de TIMP-1 en la cavidad peritoneal parece prevenir el desarrollo de endometriosis en modelos de experimentación con roedores (Bruner KL y col, 1997). Estas diferencias sugieren que la concentración aberrante de TIMP-1 podría alterar el estado proteolítico de la cavidad peritoneal y contribuir a la formación de los implantes endometriales y las adherencias observados en la endometriosis. Sin embargo, no se han estudiado estos cambios en función del estadio de la enfermedad, de manera que podrían no reflejar realmente las alteraciones presentes en estadios más avanzados.

### 1. 3. 6. 2. **Endometriosis y MMPs**

Trabajos previos han evidenciado una expresión anómala de los sistemas de las MMPs y los TIMPs en mujeres con endometriosis. Se ha identificado hasta la fecha la expresión en las lesiones endometriósicas de las MMPs -1, -2, -3 -7 y -9 y de TIMP-1 y -2 (Kokorine I y col, 1997; Wenzl RJ y col, 1998; Koks CA y col, 2000; Chung HW col, 2002).

La expresión de las distintas MMPs y TIMPs esta regulada por mecanismos hormonales y citoquinas y es específica según el tipo celular. Las lesiones endometriósicas son estructural y bioquímicamente diferentes del endometrio normal. Su localización distal a la vascularización ovárica o uterina hace pensar que no reciben los mismos niveles de esteroides ováricos. Además su contenido de receptores esteroideos es más heterogéneo y poseen la capacidad de producir aromataasa que les permite sintetizar estrógenos de forma autónoma (Sharpe-Timms KL y col, 1997 y 2001; Bulun SE y col, 1999). El aumento en la relación entre células epiteliales y estromales de los implantes endometriósicos afecta a la producción de MMPs. La progesterona activa la secreción de *TGF- $\beta$*  por las células estromales endometriales que finalmente inhibe la producción de MMPs. Asimismo, las células estromales de las mujeres con endometriosis poseen una mayor sensibilidad al estímulo por citoquinas y una menor expresión de MMPs en respuesta al estímulo esteroideo (Tseng JF y col 1996; Segars JH y col, 1997; Bruner-Tran KL y col, 2002).

Tal y como se ha descrito previamente, la MMP-1 participa en la menstruación y su inhibición puede evitar el desencadenamiento de la misma (Marbaix E y col, 1996). Las lesiones endometriósicas consideradas activas por presentar una importante vascularización y actividad proliferativa (lesiones rojas) expresan MMP-1. Sin embargo, ésta MMP está ausente en las lesiones antiguas inactivas (lesiones negras y fibrosas), incluso durante la fase menstrual. La MMP-1 estaría implicada en el inicio de la endometriosis y en la capacidad de los fragmentos endometriósicos para reimplantarse a distancia. Merece la pena destacar que, contrariamente a lo observado en el endometrio normal, en la endometriosis la expresión de mRNA de esta proteasa se manifiesta también fuera del periodo menstrual (Kokorine I y col, 1997).

La MMP-2 ha sido estudiada mediante inmunohistoquímica en los implantes endometriósicos. Se ha evidenciado una mayor expresión de de la misma en el componente glandular de dichos implantes, aunque no se han encontrado diferencias a nivel endometrial (Wenzl RJ y Heizl H, 1998). Sin embargo, en las pacientes con estadios avanzados de endometriosis se ha comprobado una mayor expresión de mRNA de MMP-2 y una disminución de los niveles de TIMP-2 en el endometrio uterino (Chung HW y col, 2002).

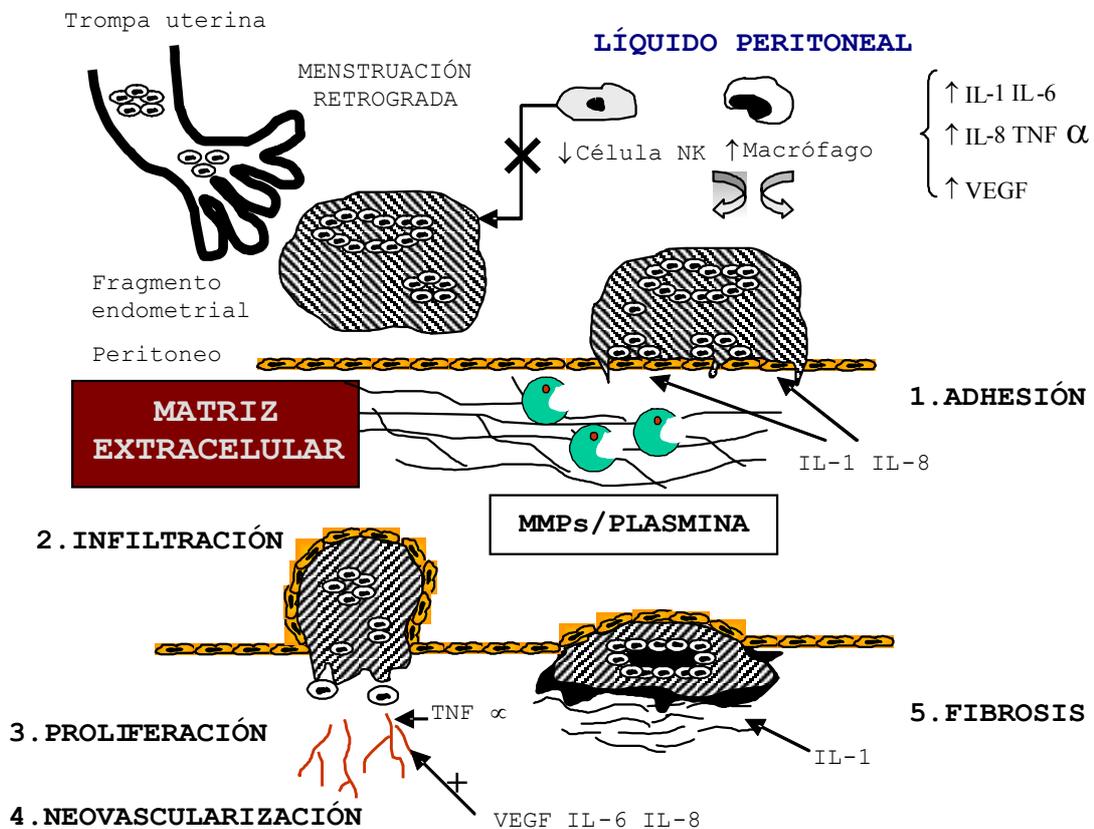
La secreción de MMP-3 también está alterada en el tejido endometriósico. Su expresión se encuentra aumentada en este tejido a lo largo de la fase secretora, hecho que puede ser revertido con la administración de danazol (Saito T y col, 1995). Al contrario que las MMP-1 y -7 que se producen focalmente a nivel estromal y epitelial respectivamente, la MMP-3 se expresa de manera más difusa en el tejido endometrial. Esta característica le confiere una importancia fundamental para la mejor comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad. La concentración de MMP-3 es muy alta en extractos de tejido endometrial de mujeres con endometriosis, mientras que las MMP-1, -2 y -9 se expresan en concentraciones menores (Sillem M y col, 2001). Otros autores han identificado a la MMP-3 como una proteasa de secreción estromal cuya acción es predominante en el remodelado de la matriz extracelular del tejido endometriósico (Bellingard V y col, 1996).

Estudios *in vivo* confieren a la IL-1 el papel de activador específico de esta proteasa en medios de cultivo (Sharpe-Timms KL y Cox K, 2002). Mientras que la expresión del mRNA de MMP-3 está disminuida durante la fase secretora en el endometrio normal, las mujeres con endometriosis la expresan en esta fase, tanto en el endometrio eutópico como en el tejido endometriósico (Bruner-Tran KL y col, 2002). Modelos de experimentación con roedores han detectado mRNA de MMP-3 en el tejido endometriósico, pero no en el endometrio eutópico. Dicha expresión se mantiene constante hasta cuatro semanas tras la exéresis quirúrgica de los implantes endometriósicos (Cox KE y col, 2001).

El endometrio humano expresa matrilisina, o MMP-7, solamente durante la fase proliferativa. Sin embargo, en el endometrio ectópico la expresión de esta metaloproteasa persiste durante todo el ciclo. Es la única MMP de síntesis exclusiva epitelial y su regulación depende de la acción de la progesterona sobre el componente estromal que se encuentra alterado, por otra parte, en los focos endometriósicos (Bruner KL y col, 1995).

Se ha descrito la presencia de unos niveles de MMP-9 mayores en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis avanzada (estadios III-IV de la *AFSr*), en comparación con el endometrio de mujeres con o sin endometriosis (Chung HW y col, 2001). Además, se ha evidenciado una disminución de los niveles de TIMP-3, tanto en el endometrio eutópico como en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis.

El TIMP-1, antes conocido como ENDO-II (*Endometriosis-Protein II*), se expresa de forma cíclica en el endometrio normal (Rodgers WH y col, 1994). En el endometrio ectópico, su expresión a nivel estromal es evidente durante todo el ciclo (Kokorine I y col, 1997). Se ha aislado TIMP-1 en los focos de endometriosis, y se ha observado que su expresión es mayor después del tratamiento con danazol (Saito T y col, 1995).



**Figura 1. 19. Fisiopatología de la endometriosis: líquido peritoneal y MMPs.** Se muestra el paso de restos de tejido endometrial con capacidad proteolítica a la cavidad peritoneal tras un proceso de menstruación retrógrada. Tras contactar con la superficie peritoneal se produce una invasión de la misma que lleva consigo un proceso de neovascularización, y finalmente da lugar a una lesión endometriósica (IL: interleuquina; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; célula NK: célula natural Killer).

## **2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Tal y como se ha descrito en la introducción, el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas pueden estar implicados íntimamente en el proceso de implantación ectópica del tejido endometrial.

En relación con el sistema fibrinolítico, existe controversia respecto al papel del sistema de activación del plasminógeno en la patogénesis de la endometriosis. Concretamente, se ha evidenciado un aumento de los niveles antigénicos de uPA y PAI-1 en extractos citosólicos de tejido endometriósico (Bruse C y col, 1998). Sin embargo, en medios de cultivo existe una menor liberación de uPA en las células endometriósicas (Guan YM y col, 2002). Por otra parte, no se ha descrito el papel que otros componentes del sistema fibrinolítico, como el PAI-3, desempeñarían en el desarrollo de esta enfermedad.

Existen estudios contradictorios respecto al papel del sistema de las metaloproteasas en la endometriosis. En este sentido, se ha evidenciado un aumento en los niveles de MMP-3 y TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivos de células endometriales de pacientes con endometriosis (Sharpe-Timms KL y Cox K, 2002). Sin embargo, en modelos de experimentación con roedores se ha detectado mRNA de la MMP-3 en el tejido endometriósico, pero no en el endometrio eutópico (Cox KE y col, 2001). Además, otros autores han referido una disminución de los niveles de TIMP-1 en el líquido peritoneal y en el suero de las mujeres con endometriosis (Sharpe-Timms KL y col, 1998a). La MMP-3 es una proteasa fundamental en el desencadenamiento del proceso de la menstruación. A diferencia de otras MMPs, su expresión es difusa en el tejido endometrial y no está tan influenciada por las variaciones en los niveles de progesterona. Por otra parte el TIMP-1 ha demostrado inhibir selectivamente a esta MMP, siendo determinante en la expresión de la misma.

Sin embargo, los estudios publicados no determinan los niveles antigénicos de los componentes de ambos sistemas en conjunto. Además, los niveles antigénicos de las proteínas no permiten distinguir entre las formas activas, inactivas y complejos. Sería por lo tanto importante cuantificar los niveles funcionales de las proteínas y, si ello no es posible, cuantificar específicamente los complejos formados entre enzima e inhibidor. Por otra parte, la mayoría de estudios en tejido endometrial valora exclusivamente la fracción citosólica, y sería conveniente valorar también el extracto de la fracción de membrana, donde se ha descrito que quedan ancladas parte de las proteínas estudiadas.

La finalidad del presente estudio es analizar el papel patogénico de los diversos componentes del sistema de activación del plasminógeno y de las metaloproteasas en el tejido endometriósico, en el endometrio eutópico y en el líquido peritoneal. De esta forma, se intentará establecer la relación entre ambos sistemas y el tejido endometrial ectópico, así como dilucidar su posible implicación en el proceso de recidiva de la enfermedad.

El desarrollo de este proyecto se define sobre una serie de objetivos concretos a realizar en las muestras de tejidos obtenidos de pacientes con endometriosis y de mujeres normales consideradas como controles.

Los objetivos específicos a desarrollar son los siguientes:

1.- Cuantificar en las muestras de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis los niveles antigénicos y funcionales de diversos componentes del sistema fibrinolítico y de las MMPs.

Se realizará un estudio del conjunto de los componentes del sistema fibrinolítico. Se valorarán los niveles antigénicos y funcionales de los activadores del plasminógeno (uPA, tPA), así como de los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI-1, PAI-2 y PAI-3) y los complejos enzima:inhibidor. Dentro del sistema de las MMPs se analizará selectivamente los niveles antigénicos y funcionales de la MMP-3 y el TIMP1.

2.- Estudiar la variación de los componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas en función de la evolución de la enfermedad y el estadio de la misma. Se prestará una especial atención a la evolución de las pacientes, con el objeto de identificar los casos de recidiva y valorar en las mismas la posible existencia de una expresión tisular diferente de los componentes de ambos sistemas.

3.- Valorar los niveles de dichos componentes en el líquido peritoneal control y de mujeres con endometriosis. Con estos datos se estudiará el estado proteolítico peritoneal y así analizar su posible papel determinante en el proceso de implantación de los fragmentos endometriales tras un proceso de menstruación retrógrada.

4.- Proceder a la localización tisular de los componentes del sistema fibrinolítico mediante técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3. 1. GRUPOS CLÍNICOS**

Tanto las pacientes diagnosticadas de endometriosis como las mujeres sin la enfermedad, incluidas en el grupo control, procedían en su totalidad del Hospital Maternal La Fe y del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes y todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (*Declaration of Helsinki*, 1976).

#### **3. 1. 1. MUJERES SIN ENDOMETRIOSIS**

El grupo control estaba constituido inicialmente por 40 mujeres sin endometriosis a las cuales se practicó una intervención quirúrgica (vía laparoscópica o laparotómica) según los criterios clínicos expuestos en la *tabla 3. 1*. Tres pacientes fueron excluidas del estudio por haberse obtenido una muestra endometrial en cantidad insuficiente o con niveles de proteína no valorables. Ninguna de las 37 mujeres incluidas en el estudio dentro del grupo control estaba recibiendo medicación de tipo hormonal, había estado embarazada o había dado lactancia materna en los 6 meses previos a la intervención. La edad media fue de 40 años (rango, 31-49). El 13% de las mujeres eran estériles y el 22% nulíparas. La clínica más frecuentemente presente era el dolor pélvico crónico (16%). Se consideró como criterio de inclusión la existencia de ciclos menstruales regulares.

Se identificó el momento del ciclo menstrual en que se encontraba cada paciente según su fecha de última menstruación. Se clasificó en función de que la fase del ciclo fuera proliferativa (n=14), secretora (n=22) o menstrual (n=1) (*Figura 3. 1*). Se comprobó la fase del ciclo menstrual en la que se encontraba el tejido endometrial obtenido durante la intervención de acuerdo con criterios histológicos (Noyes RW y col, 1950).

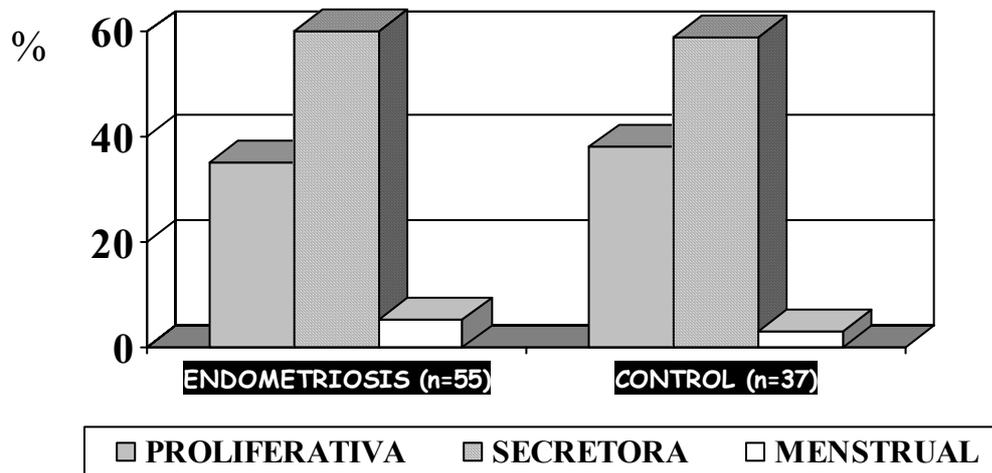
La ausencia de endometriosis se verificó mediante el examen sistemático de la cavidad abdominal, prestando especial atención a la presencia de lesiones atípicas, como imágenes vesiculares, defectos peritoneales o cuadros adherenciales que pudieran sugerir estadios iniciales de la enfermedad.

INDICACIÓN QUIRÚRGICA	MUJERES SIN ENDOMETRIOSIS (n=37) n (%)	MUJERES CON ENDOMETRIOSIS (n=55) n (%)
Esterilidad		
Primaria	4 (10,8)	24 (44,6)
Secundaria	1 ( 2,7)	2 ( 3,6)
Dolor pélvico crónico	6 (16,2)	7 (12,8)
Dismenorrea	3 ( 8,1)	22 (40,0)
Defecto suelo pélvico	3 ( 8,1)	---
Quiste anexial	---	42 (76,4)*
Esterilización tubárica	20 (54,0)	---

**Tabla 3. 1. Características clínico-quirúrgicas de las pacientes estudiadas.** Se ha considerado el síntoma principal que es indicación de la cirugía. (\*) Se han incluido pacientes con diagnóstico ecográfico o clínico de quiste anexial mayor de 3 cm sugestivo de endometrioma y que presentaban esterilidad o algias pélvicas asociadas. Los valores expresados entre paréntesis son porcentajes

PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	MUJERES SIN ENDOMETRIOSIS (n=37) n (%)	MUJERES CON ENDOMETRIOSIS (n=55) n (%)
<i>Laparoscopia</i>	13 (35,1)	47 (85,4)
<i>Laparotomía</i>	24 (64,9)	8 (14,6)
<i>Procedimiento principal</i>		
Quistectomía	---	42 (76,4)
Drenaje y coagulación	---	3 ( 8,1)
Vaporización implante	---	15 (27,3)
Ligadura tubárica	20 (54,0)	0 ( 0,0)
Anexectomía	---	8 (21,6)
Adhesiolisis	5 (13,6)	41 (74,5)
Histerectomía	12 (32,4)	6 (10,9)
<i>Procedimientos asociados</i>		
LUNA	---	4 (10,8)
Miomectomía	---	1 ( 1,8)
Apendicectomía	---	3 ( 8,1)

**Tabla 3. 2. Tipo de cirugía realizado en cada grupo de pacientes.** Cada paciente puede haber sido sometida a más de un procedimiento principal o accesorio. Los valores expresados entre paréntesis son porcentajes (LUNA: Ablación Laparoscópica de Nervios Uterosacros).



**Figura 3. 1. Fases del ciclo de toma de la muestra.** La fase del ciclo fue determinada mediante examen de las preparaciones histológicas de endometrio o mediante estimación clínica según la fecha de última menstruación, en caso de no disponer de muestra de tejido endometrial. La distribución de las fases del ciclo fue similar en ambos grupos (p: NS).

### 3. 1. 2. MUJERES CON ENDOMETRIOSIS

El grupo de mujeres con endometriosis estaba constituido inicialmente por un total de 60 pacientes con endometriosis. Cinco de ellas fueron excluidas al presentar como único signo de la enfermedad la presencia de un quiste anexial de probable etiología endometriósica, finalmente descartada con el estudio anatomopatológico diferido. El diagnóstico de sospecha de endometriosis fue clínico, ecográfico o bioquímico. El nivel medio de antígeno CA 125 en sangre fue de 65,9 mg/dl (rango, 19-144).

La edad media fue de 34 años (rango, 21-47). El 48% de las mujeres eran estériles y el 65% de las mismas eran nulíparas. El 52% de estas pacientes presentaban algún tipo de sintomatología dolorosa. Todas las mujeres tenían ciclos menstruales regulares. Los procedimientos quirúrgicos realizados quedan resumidos en la *tabla 3. 2*. Ninguna mujer había recibido tratamiento de tipo hormonal, había estado embarazadas o dado lactancia materna en los 6 meses previos a la intervención. Se recogió información sobre las características del ciclo y el momento de la última menstruación para identificar la fase del ciclo. Se identificaron las pacientes que se encontraban en fase proliferativa (n=19), secretora (n=33) o menstrual (n=3) (*Figura 3. 1*). En todas aquellas pacientes en que se obtuvo muestra endometrial se comprobó histológicamente la fase del ciclo.

La identificación de la endometriosis se realizó mediante la valoración macroscópica de las características del quiste anexial y su contenido, así como del aspecto de los implantes peritoneales tras un examen sistemático de la cavidad abdominal. Se realizó una búsqueda minuciosa de implantes peritoneales, lesiones atípicas, defectos peritoneales o adherencias para realizar un correcto estadiaje de la enfermedad. En todos los casos se comprobó en el examen anatomopatológico diferido la presencia de glándulas endometriales y estroma en las muestras extraídas. La extensión de la endometriosis se valoró según la clasificación revisada de la *American Fertility Society* (AFSr, 1996), agrupándose en estadios I-II o endometriosis mínima-leve (n=5) y estadios III-IV o endometriosis moderada-severa (n=50), para facilitar el análisis de los datos.

Se realizó un seguimiento evolutivo de las pacientes durante un tiempo medio de 16,7 meses (rango 6-40) con el objeto de identificar aquéllas en las que la endometriosis se expresara con una clínica más agresiva. Durante dicho periodo se evaluó la posible existencia de recidiva de la enfermedad mediante un exhaustivo seguimiento clínico y ecográfico. Las pacientes que no tuvieron un seguimiento mínimo de 6 meses (n=18) fueron excluidas del análisis de la recidiva. Se identificó un grupo de pacientes en las que no se produjo recidiva clínica o ecográfica (n=24) y un segundo de pacientes en las que se comprobó la existencia de recidiva mediante cirugía (n=13). En el grupo de pacientes con recidiva el nivel medio de antígeno CA 125 en sangre fue de 48,6 mg/dl (rango, 14-128), mientras que el grupo sin recidiva fue 54,4 (rango, 11-144). Además, se evaluaron las características de las lesiones presentes en la cirugía inicial para evidenciar el grado de extensión de la enfermedad antes del tratamiento (*Tabla 3. 3*).

<b>CARACTERÍSTICAS DE LAS LESIONES INICIALES</b>	<b>NO RECIDIVA (n=24) n (%)</b>	<b>RECIDIVA (n=13) n (%)</b>
<i>Lesiones ováricas</i>		
Endometrioma <5 cm	10 (35,7)	4 (36,3)
Endometrioma > 5 cm	8 (28,6)	4 (36,3)
Endometrioma bilateral	9 (32,1)	3 (27,2)
Implantes endometriósicos	2 (7,1)	0 (0)
<i>Lesiones peritoneales</i>		
Antiguos	10 (35,7)	6 (54,5)
Activos	2 (7,1)	1 (9,0)
Atípicas	2 (7,1)	1 (9,0)
<i>Adherencias</i>		
Laxas	14 (50,0)	9 (81,8)
Densas	4 (14,2)	2 (18,1)
Douglas obliterado	6 (21,4)	2 (18,1)

**Tabla 3. 3. Características de las lesiones de endometriosis en función de la recidiva.** Cada paciente puede presentar varias lesiones. La existencia de recidiva se comprobó quirúrgicamente y la ausencia de recidiva se verificó clínica y ecográficamente. Los valores expresados entre paréntesis son porcentajes.

## **3. 2. MUESTRAS**

### **3. 2. 1. ENDOMETRIO CONTROL**

Durante el procedimiento quirúrgico, bajo anestesia general, se obtuvo una muestra de tejido endometrial en cada una de las pacientes del grupo control. Tras un reconocimiento bajo anestesia y un examen con espéculo se extrajo una biopsia endometrial mediante una cánula de aspiración endometrial.

### **3. 2. 2. ENDOMETRIO EUTÓPICO**

Mediante un procedimiento análogo al utilizado para la obtención de tejido endometrial en los controles, se realizó un aspirado endometrial en 37 de las 50 mujeres con endometriosis.

### **3. 2. 3. ENDOMETRIO ECTÓPICO**

Las muestras de tejido endometriósico se obtuvieron de la cápsula de endometriomas ováricos. En la mayoría de los casos (n=42), la técnica quirúrgica permitió realizar una quistectomía siguiendo el plano de disección entre el endometrioma y el parénquima ovárico sano, por lo que se tomó una muestra significativa de este tejido. En los casos en que se realizó una anexectomía que incluía el endometrioma, el tejido ovárico adyacente fue separado de forma macroscópica mediante bisturí frío inmediatamente tras la intervención.

Una biopsia del endometrioma fue remitida al laboratorio en todos los casos para realizar un estudio anatomopatológico diferido. La presencia de endometriosis fue comprobada mediante la identificación de glándulas y estroma endometrial en el examen histológico.

### 3. 2. 4. LÍQUIDO PERITONEAL

El líquido peritoneal se obtuvo en todos los casos durante el procedimiento quirúrgico realizado por laparoscópica. Se recogió una muestra de líquido peritoneal en las pacientes sometidas a esterilización tubárica (n=13), y en el grupo de pacientes con endometriosis (n=29), cuando existía un volumen significativo en la pelvis menor. Por el contrario, no se tomó ninguna muestra de líquido peritoneal de las pacientes intervenidas por laparotomía para minimizar el riesgo de contaminación hemática de la muestra.

Tras acceso laparoscópico a la cavidad peritoneal mediante un sistema de trócares, se procedió a separar el paquete intestinal para visualizar correctamente la pelvis menor e identificar la presencia de líquido peritoneal. Las muestras de trasudado peritoneal se recogieron cuidadosamente del fondo de saco de Douglas y del espacio vesicouterino, tal y como se describe en estudios previos (Bouckaert y col, 1986). Se realizó una aspiración del mismo con un sistema cerrado con una cánula laparoscópica conectada a una jeringa estéril. Se desecharon las muestras en las que se evidenció contaminación macroscópica del trasudado peritoneal con restos hemáticos durante el acceso quirúrgico. No se realizaron lavados peritoneales previamente a la recolección de las muestras ni tampoco se utilizó anticoagulante. El procedimiento utilizado fue similar para los dos grupos de pacientes estudiados.

### 3. 2. 5. PREPARACIÓN Y SEPARACIÓN DEL TEJIDO

Tras obtener las diferentes muestras tisulares se procedió a su lavado en tampón fosfato salino (*PBS, Dulbecco's; Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, United Kingdom*). Todas las muestras de tejido se evaluaron microscópicamente para confirmar el diagnóstico.

Los extractos citosólicos de las muestras se obtuvieron por homogeneización del tejido en tampón Tris-HCl 10 mmol/l que contenía EDTA 1,5mmol/l y 10% de glicerol. La suspensión se centrifugó a 100.000 x g, a 4°C durante 15 minutos para separarlo de la fracción membranosa (*pellet*) y el sobrenadante (extracto de fracción citosólica) se alícuotó y se almacenó a -80°C (Bouchet-Bernet C y col, 1995).

Los extractos de membrana se obtuvieron por solubilización del *pellet* en tampón Tris-HCl 20 mmol/l que contenía NaCl 125 mM y 1% Tritón X-100, se incubaron toda la noche a 4°C, se centrifugaron a 100.000 x g a 4°C durante 15 minutos y posteriormente el sobrenadante (extracto de membrana) se alicuotó y congeló a -80°C (Bouchet-Bernet C y col, 1995).

Tras la recogida de las muestras de líquido peritoneal, tal y como se describe previamente (Bouckaert y col, 1986), se almacenó en nevera hasta la finalización del procedimiento quirúrgico. El líquido peritoneal se centrifugó inmediatamente después a 1.500 x g durante 30 minutos a 4°C con el fin de separar las células y el sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80°C.

Para la obtención de cortes histológicos aptos para microscopía óptica necesaria tras las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, las secciones se fijaron durante la noche en paraformaldehído a 4°C y se embebieron en bloques de parafina.

Para la extracción y cuantificación posterior de las proteínas presentes en el tejido endometrial y endometriósico, las muestras se seccionaron de nuevo en piezas más pequeñas ( $\leq 1 \text{ mm}^3$ ) y se lavaron intensamente en tampón PBS. A continuación, se congelaron en nitrógeno líquido donde se conservaron hasta el análisis.

### **3.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS, FUNCIONALES Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Los niveles antigénicos de los distintos parámetros se determinaron en extractos citosólicos y de membrana. Los niveles funcionales de PAI-1, uPA y tPA se evaluaron exclusivamente en fracción citosólica, ya que la solubilización de las membrana con Tritón X-100 disminuye o bloquea la funcionalidad de las proteínas.

#### **3.3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES**

Los niveles de proteínas totales se cuantificaron utilizando una técnica comercial (*BCA assay*, Pierce, Rockford, IL). Se utilizó albúmina de suero bovino (*BSA*), fracción V (*Sigma*) se utilizó para realizar la curva estándar de referencia. Las muestras y los controles se determinaron por duplicado para comprobar la precisión de la cuantificación.

La técnica se realizó siguiendo las especificaciones de la casa comercial que, en esencia, consiste en una reacción colorimétrica cuyos resultados se comparan con una curva patrón de concentración conocida de proteína (albúmina). El sistema combina la conocida reacción de la proteína con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino con un reactivo altamente sensible y selectivo para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$ , denominado ácido bicincomínico. El ensayo es un método altamente sensible con determinación espectrofotométrica a 550 nm.

### **3. 3. 2. CUANTIFICACIÓN ANTIGÉNICA Y FUNCIONAL DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS MMPS**

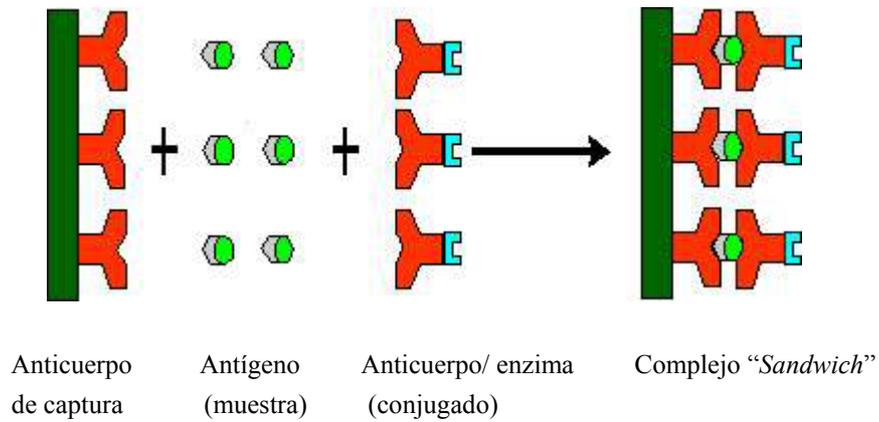
La determinación de los distintos parámetros se llevó a cabo mediante técnicas de enzimoinmunoensayo (ELISA) para la valoración antigénica de los mismos, y con técnicas amidolíticas para la determinación funcional

#### **3. 3. 2. 1 Determinación antigénica del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1 ag)**

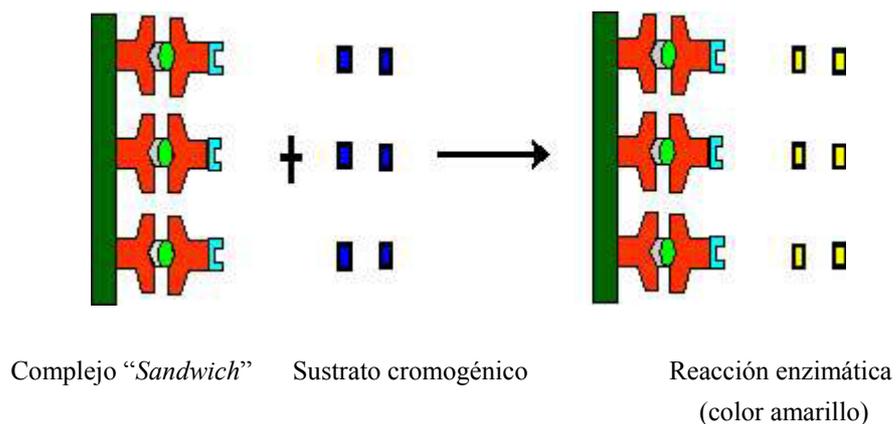
El PAI-1 ag se determinó utilizando un kit comercial de ELISA (*TintElize PAI-1, Biopool*). El PAI-1 se encuentra en varias formas: activo, inactivo (latente) y acomplejado con tPA y uPA. El ensayo utilizado cuantifica todas las formas con la misma eficiencia. La variabilidad intraensayo e interensayo es 3% y 7%, respectivamente.

Para la determinación antigénica del PAI-1 se utilizó el tipo de ELISA de "doble anticuerpo", o "*sandwich*". El esquema de las técnicas de ELISA sería el siguiente:

- 1) *Reacción inmunológica*: Los pocillos de la microplaca se incuban con un exceso del anticuerpo de captura, generalmente un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína a valorar. La muestra, convenientemente diluida, se incuba en la microplaca para lograr la completa unión de todo el antígeno de la muestra al anticuerpo de captura. Tras lavado de la placa, se incuba con un exceso de un segundo anticuerpo conjugado con un enzima, el anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección se une al antígeno inmovilizado y forma un "*sandwich*" anticuerpo-antígeno-anticuerpo/enzima unido al pocillo. La cantidad de enzima unido al pocillo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.



2) *Reacción enzimática y cuantificación:* A continuación se lava la microplaca, para separar la fracción de anticuerpo conjugado que no se ha unido, y se añade un sustrato sobre el cual actuará el enzima dando un producto coloreado (color amarillo). La absorbancia a una determinada longitud de onda, medida espectrofotométricamente, será proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. Paralelamente, en cada placa se incluye un estándar de diferente concentración conocida del antígeno a valorar, para poder construir una curva de calibración.



Para aumentar la especificidad de la reacción se utilizó el sistema ISAC (*Immunological Specificity and Accuracy Control*). Para ello cada muestra se deposita por duplicado en dos pocillos. El pocillo A contiene un exceso de anticuerpo en solución, de tal manera que todo el antígeno que contenga la muestra se unirá al anticuerpo en solución y se evita así que se una al anticuerpo prefijado a la fase sólida. Este pocillo se utilizará como blanco de cada muestra, lo que evita cualquier respuesta inespecífica. El pocillo N contiene inmunoglobulina inespecífica, de modo que el antígeno de la muestra se unirá al anticuerpo prefijado al pocillo y no al anticuerpo en solución.

Básicamente, el protocolo utilizado es el siguiente:

- 1) Se disuelve el vial de tampón PET (PBS/EDTA/Tween 20) en 1 litro de agua destilada.
- 2) Se preparan diluciones de PAI-1 a concentraciones de 30, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 y 0 ng/ml.
- 3) Se reconstituye la placa con 100  $\mu$ l/pocillo de tampón PET y se agita suavemente 1 minuto. Es importante evitar la contaminación del pocillo N con el contenido del pocillo A, pues infravaloraríamos el valor de PAI-1 de la muestra.
- 4) Se añade 20  $\mu$ l/pocillo de cada muestra o estándar al pocillo N y al adyacente pocillo A.
- 5) Se reconstituye el liofilizado de anti-PAI-1 policlonal conjugado con peroxidasa con 6 ml de tampón PET, y se añade 50  $\mu$ l a cada pocillo.
- 6) Se incuba 2 horas a temperatura ambiente con agitación (500-600 rpm) y se lava la placa 4 veces con tampón PET.

- 7) Se reconstituye el sustrato ortofenildiaminodihidrocloro (OPD) con 22 ml de agua bidestilada y se añade, en el momento de utilizarlo, el vial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se añade 200 µl de sustrato a cada pocillo. Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- 8) Se añade 50 µl de solución STOP (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,3M), se mide la absorbancia a 492 nm y se sustrae la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas EAR 400 AT. SLT (*Labinstruments*). La concentración se calcula a partir de la curva patrón obtenida con los valores de absorbancia producidos por los estándares.

### **3. 3. 2. 2 Determinación funcional del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1 fc)**

El ensayo funcional del PAI-1 consiste en valorar la capacidad inhibitoria que la muestra tiene sobre el tPA de una cadena (sct-PA) añadido a la muestra. En una primera etapa, parte del sct-PA añadido a la muestra es inhibido por el PAI-1 de la muestra a determinar. Posteriormente, mediante acidificación se destruyen otros inhibidores que puedan interferir en el ensayo. En una segunda etapa, se mide la actividad residual del tPA tras añadir a la muestra una mezcla de plasminógeno, fibrina y sustrato cromogénico. Esto permite que el tPA funcional residual active el plasminógeno en plasmita y que ésta actúe sobre el sustrato cromogénico para liberar pNA de color amarillo. Así pues, la cantidad de color producida será directamente proporcional a la cantidad de tPA de la muestra. Así se cuantifica el PAI-1 fc por la diferencia existente entre el tPA añadido y el tPA valorado al final del ensayo. La variabilidad intra e interensayo es 6% y 9% respectivamente.

Básicamente, el protocolo utilizado es el siguiente (Estellés A y col, 1994):

- 1) Se incuba un volumen de tPA (sct-PA 40 UI/ml. *American Diagnostica*) con un volumen igual de muestra en tampón fosfato sódico 0,02 M pH 7,3, NaCl<sub>2</sub> 0,1 M, durante 10 minutos a temperatura ambiente (concentración final de tPA es 2 UI./ml).
- 2) La reacción se detiene mediante acidificación con un volumen igual de acetato sódico 1 M pH 3,9 durante 15 minutos y posteriormente se diluye a 1/50 con tampón Tris-HCl 0,05 M pH 8,8, NaCl<sub>2</sub> 0,1 M, Tritón X-100 0,1 µg/l.
- 3) El volumen obtenido se mezcla con un volumen igual de una mezcla que contiene 1 M plasminógeno (*Chromogenix*), 0,6 mM S-2251 (*Chromogenix*) en el mismo tampón. A esta mezcla se le añade fibrina soluble a una concentración final de 0,07 g/l y se incuba durante 3 h a 37°C.
- 4) Se mide la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas EAR 400 AT. SLT (*Labinstruments*), y se sustrae la absorbancia a 492 nm. Las muestras se leen frente a un blanco acidificado inmediatamente sin periodo de incubación que contiene muestra y tPA.
- 5) La actividad del tPA residual se determina midiendo la generación de plasmina generada después de la adición de plasminógeno, fibrina soluble y sustrato cromogénico
- 6) La actividad funcional del PAI-1 se determina a partir de la diferencia entre el tPA añadido y el tPA residual. Se define como 1 UI de PAI-1 funcional, la cantidad que inhibe 1 UI de sct-PA en 10 minutos a temperatura ambiente. Los valores de las muestras se dan en relación a una curva patrón realizada con distintas concentraciones de patrón internacional de tPA.

### **3. 3. 2. 3. Determinación antigénica del activador tisular del plasminógeno (tPA ag)**

La determinación del tPA ag se llevó a cabo utilizando un kit comercial de ELISA (*TintElize tPA, Biopool*). El ensayo cuantifica tanto las formas libres de tPA como las acomplejadas con los inhibidores con la misma eficiencia. El protocolo aplicado es prácticamente el mismo que el descrito anteriormente para el PAI-1 ag, con la única diferencia de que los anticuerpos de captura y detección son específicos para el tPA. El coeficiente de variación intraensayo e interensayo es 4% y 6%, respectivamente.

### **3. 3. 2. 4. Determinación funcional del activador tisular del plasminógeno (tPA fc)**

Para analizar el tPA fc se utilizó una técnica cromogénica descrita previamente (Gilabert J y col, 1995). La variabilidad intra e interensayo fue 8% y 12%, respectivamente. La adición de plasminógeno a la muestra generará plasmina proporcionalmente a la cantidad de tPA existente en la muestra problema. Se añade también fibrina soluble para acelerar la producción de plasmina por el tPA.

Básicamente, el protocolo utilizado es el siguiente:

- 1) 0,1 ml de muestra se diluye a 1/16 en tampón Tris-HCl 0,05 M pH 8,8, NaCl<sub>2</sub> 0,1 M, Tritón X-100 0,1% y se incuba con 0,1 ml de una mezcla que contiene plasminógeno 1 M y S-2251 0,6 mM en el mismo tampón. A esta mezcla se le añade fibrina soluble a una concentración final de 0,07 g/l.
- 2) Se incuba durante 3-5h a 37°C y se mide la absorbancia a 405 nm y se sustrae la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas EAR 400 AT. SLT (*Labinstruments*). Los valores se contrastan con una curva patrón realizada con distintas concentraciones conocidas de tPA.

### **3. 3. 2. 5 Determinación antigénica del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 (PAI-2 ag)**

El PAI-2 ag se cuantificó por un ELISA comercial (*Imubind PAI-2, American Diagnostica*). El ensayo reconoce con igual sensibilidad el PAI-2 libre y el los complejos PAI-2:uPA. La variabilidad intra e interensayo es 4,5% y 8%, respectivamente.

El desarrollo de la técnica es equivalente al detallado para la cuantificación antigénica del PAI-1.

### **3. 3. 2. 6. Determinación antigénica del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA ag)**

La uPA antigénica se cuantificó por un ELISA comercial (*Zymutest uPA, Hyphen Bomed*). Dicho ensayo mide con similar eficacia tanto la uPA de una cadena (scu-PA) como la uPA de alto peso molecular (HMW-uPA). La uPA de bajo peso molecular (LMW-uPA) es cuantificada con alrededor de un 40% de eficacia en relación a la scu-PA y HMW-uPA. La variabilidad intra e interensayo es de 4% y 10%, respectivamente.

### **3. 3. 2. 7 Determinación funcional del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA fc)**

Los niveles funcionales de uPA se determinaron por inmunoabsorción (*Chromolize uPA, Biopool*). La variabilidad intra e interensayo es 6% y 11% respectivamente.

Esta técnica determina tanto tcu-PA como scu-PA, ya que este último también puede activar al plasminógeno en las condiciones del ensayo. Asimismo, puede cuantificar tanto la HMW-uPA como la LMW-uPA.

A continuación se detalla el protocolo utilizado:

- 1) Se reconstituye el vial de scu-PA con 1 ml de tampón PET y se obtiene una concentración de 100 ng/ml. Se diluye con tampón PET a 1/10 para obtener 10 ng/ml y se hacen diluciones sucesivas para obtener las concentraciones de 1, 0.7, 0.5, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 y 0 ng/ml.
- 2) Se añaden las muestras y los patrones a la placa donde ya está prefijado el anticuerpo. Se agita suavemente durante un minuto.
- 3) Se incuba durante dos horas a temperatura ambiente en agitación con la placa tapada y se lava la placa cuatro veces con tampón PET.
- 4) Se reconstituye el sustrato con el plasminógeno incorporado con 12,5 ml de tampón imidazol y se añaden 200 µl a cada pocillo de la placa. Se incuba 90 minutos a 37°C.
- 5) Se detiene la reacción y se mide la absorbancia a 405 nm. La concentración de uPA puede extrapolarse a partir de la curva patrón, teniendo en cuenta que el resultado engloba a la actividad de uPA y a la scu-PA activable.

### **3. 3. 2. 8. Determinación antigénica del receptor de la uroquinasa (uPAR)**

El uPAR se determine por un ELISA comercial (*Imubind, total uPAR, American Diagnostica*) que detecta tanto el uPAR libre como el acomplexado. La variabilidad intra e interensayo es 5% y 7%, respectivamente.

### **3. 3. 2. 9. Determinación antigénica del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3 (PAI-3 ag)**

Los niveles antigénicos de PAI-3 se midieron por un ELISA, como se ha descrito previamente (España F y col, 1989; España F y col, 1991). La variabilidad intra e interensayo es 6% y 8%, respectivamente.

### **3. 3. 2. 10. Determinación antigénica de los complejos del PAI-3 (uPA:PAI-3 y tPA:PAI-3)**

Los complejos uPA:PAI-3 y tPA:PAI-3 se cuantificaron por ELISAs, como se han descrito previamente (España F y col, 1993). Las variabilidades intra e interensayo son 5% y 9% para uPA:PAI-3 y de 7% y 12% para tPA:PAI-3, respectivamente.

### **3. 3. 2. 11. Determinación antigénica del inhibidor de la metaloproteasa tipo 3 (MMP-3 ag)**

La MMP-3 ag se cuantificó mediante un ensayo comercial de ELISA (*MMP-3 ELISA, Oncogene*). El ensayo detecta la MMP-3 libre, pero no los complejos MMP-3:TIMP. La variabilidad intra e interensayo es 5% y 9%, respectivamente.

### **3. 3. 2. 12. Determinación antigénica del inhibidor tipo 1 de las metaloproteasas (TIMP-1 Ag)**

Los niveles antigénicos de TIMP-1 se evaluaron por un ELISA comercial (*TIMP-1 ELISA, Oncogene*). El ensayo reconoce tanto las formas libres como las acomplexadas. La variabilidad intra e interensayo es 4% y 7%, respectivamente.

### 3.4. INMUNOHISTOQUIMIA

Las técnicas de inmunohistoquimia han alcanzado un nivel de desarrollo y estandarización tal que en la actualidad son accesibles a cualquier laboratorio clínico. Estas técnicas permiten revelar la localización exacta de una proteína a nivel tisular y, en cierta medida, una valoración semicuantitativa.

Nosotros hemos empleado técnicas inmunohistoquímicas para la localización a nivel tisular de PAI-1, uPA y PAI-3. El protocolo aplicado se basa en el descrito previamente (Estellés A y col, 1994 y 1996) y se desarrolla en una serie de pasos de deparafinación, hidratación, permeabilización, inmunodetección y revelado enzimático, tal y como se describe en la *figura 3. 2*. El protocolo consta de los siguientes pasos:

#### *Obtención de los cortes*

- 1) Los bloques de tejido fijado y embebido en parafina se cortan en secciones de 3 a 5  $\mu\text{m}$  usando un microtomo de retracción (Microm), se depositan sobre portaobjetos tratados con poli-lisina y se dejan secar al aire.

#### *Deparafinación*

- 2) Se desparafina durante 30 minutos en xileno a 37°C y se incuba 3 minutos en etanol al 100%.

#### *Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena*

- 3) Se incuba 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% y metanol.

#### *Rehidratación*

- 4) Se incuba sucesivamente en etanol al 90%, 80%, 70% y 50% durante 2 minutos cada vez.

#### *Permeabilización*

- 5) Los cortes se tratan en tampón PBS con concentraciones crecientes de Tritón X-100 (0.2%, 0.5% y 1%) durante 10 minutos cada vez.

#### *Tratamiento con pepsina*

- 6) Con el objeto de desenmascarar el antígeno se tratan durante 3 minutos a 37°C con pepsina al 0.23% en 0.01N HCl.
- 7) A continuación se lava dos veces con agua destilada y una con tampón PBS.

#### *Bloqueo de la unión inespecífica de avidina*

- 8) Se incuba durante 20 minutos con avidina al 0.1% en PBS a temperatura ambiente y se lava tres veces durante 3 minutos con PBS.
- 9) Se incuba 20 minutos con d-biotina (1mg/ml) en PBS a temperatura ambiente y lavar tres veces durante 3 minutos con PBS.

#### *Bloqueo de la unión no específica del segundo anticuerpo*

- 10) Se incuba una hora a temperatura ambiente con tampón PBS suplementado al 1% con suero de cabra.

#### *Incubación del primer anticuerpo*

- 11) Se incuba una noche a 4°C con el anticuerpo diluido al 0.1% en PBS/azida sódica y paralelamente se emplea en cada preparación una IgG preinmune de ratón. Las concentraciones finales del anticuerpo oscilan entre 10-30µg/ml dependiendo del anticuerpo empleado. Las concentraciones de los anticuerpos controles siempre son las mismas que las empleadas para el anticuerpo

ensayado. En el caso de la uPA y el PAI-1, se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón (*American Diagnostica*) a una concentración de 30 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente. Para la detección del PAI-3 se utilizó anticuerpo policlonal de conejo preparado como se describe previamente (España F y Griffin JH, 1989 c).

- 12) Al día siguiente se incuba durante una hora a temperatura ambiente y se lava tres veces durante 3 minutos con Tritón X-100 al 0,5% en PBS.

#### *Incubación del segundo anticuerpo*

- 13) Se incuba 15 minutos con el segundo anticuerpo biotinilado (Jackson) contra IgG de ratón o de conejo, diluido al 1% en PBS suplementado con Tween 20 al 0,05%.
- 14) Se lava tres veces durante 3 minutos con 0.5% tritón X-100 en PBS.

#### *Incubación con el conjugado*

- 15) Se incuba con streptavidina-pexoxidasa (Zymed) durante 10 minutos y se lava tres veces 3 minutos con 0,5% tritón X-100 en PBS.

#### *Revelado enzimático*

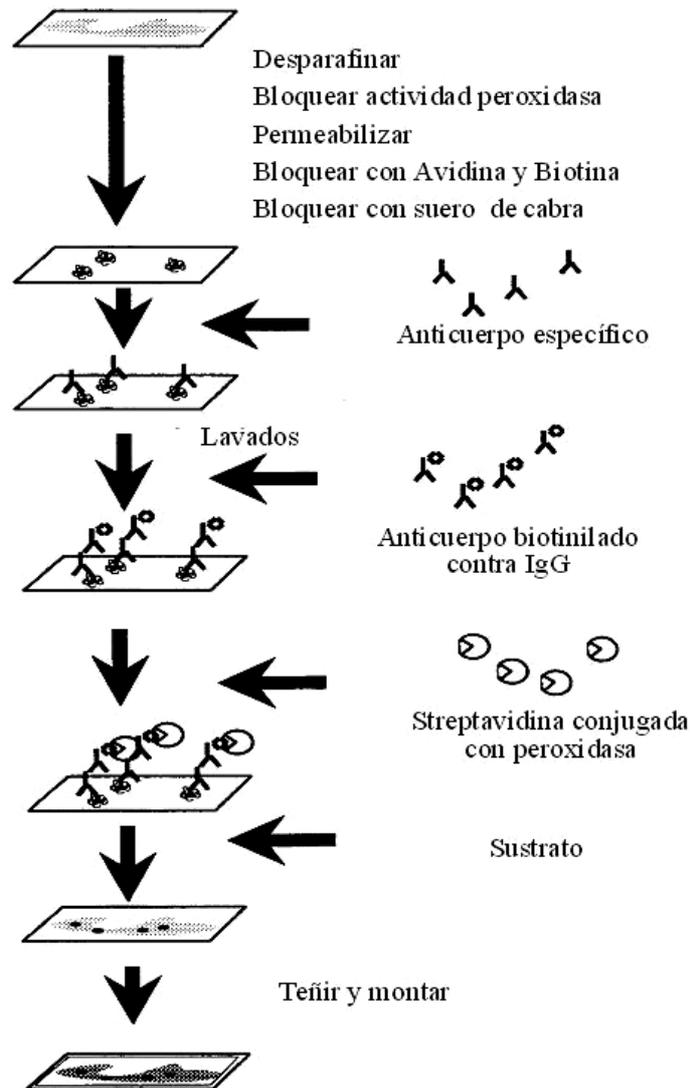
- 16) Se incuba durante 15 minutos con el sustrato aminoetilcarbazol (AEC), en presencia del tampón adecuado y de peróxido de hidrógeno. Posteriormente se lava con agua destilada.

#### *Tinción de núcleos*

- 17) Se tiñen las preparaciones con hematoxilina de Gill 3X (Sigma) durante 2 minutos y se lava abundantemente con agua corriente.

### Montaje y Visualización

- 18) Se procede entonces a cubrir los cortes cubreobjetos y con medio de montaje acuoso GVA (Zymed). La visualización se lleva a cabo en un microscopio BH-2 (Olympus) y el registro fotográfico se obtiene con películas de diapositiva de baja sensibilidad del tipo EPY-64T (Kodak).



**Figura 3. 2. Esquema del desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica.** Los cortes de tejido en parafina son pretratados tal y como se describe, e incubados con un anticuerpo específico. Se amplifica mediante un segundo anticuerpo biotinilado y se incuba con streptavidina conjugada con peroxidasa. Finalmente, se añade un sustrato cromogénico para revelar la presencia del antígeno analizado, se tiñen los núcleos y se monta la preparación.

### 3.5. HIBRIDACIÓN IN SITU

Las técnicas de hibridación *in situ* tratan de poner de manifiesto la presencia de un mRNA específico a nivel celular. La posibilidad de estudiar la expresión génica de distintos tipos celulares y de acceder, en el caso de la hibridación sobre tejido embebido en parafina, a gran cantidad de especímenes patológicos, hace de esta técnica una herramienta insustituible en el estudio de las bases moleculares de diferentes patologías. La hibridación *in situ* es además un complemento lógico a los estudios de inmunohistoquímica, ya que permite dilucidar el origen de las proteínas localizadas previamente mediante esta técnica inmunológica. (Angerer LM y col, 1987 y 1991; Hoefler H, 1990; Long A y col 1992; Moorman AFM y col 1993; Wilcox JN, 1993)

Por todo ello, la hibridación *in situ* ha emergido como una valiosa herramienta para la identificación de células individuales que expresan genes específicos. Recientemente las técnicas de marcaje, hibridación y autorradiografía han alcanzado una sensibilidad suficiente como para poder detectar mRNAs presentes en el citoplasma celular a nivel de unas pocas moléculas por célula. De hecho, cuando los mRNAs investigados están siendo producidos sólo por un pequeño número de células dentro del tejido, la hibridación *in situ* puede ser la técnica de hibridación de ácidos nucleicos más sensible a nuestra disposición.

Una cuestión clave en la hibridación *in situ* es el tipo de sonda a emplear para la hibridación y su marcaje. Llevar a cabo el proceso de hibridación directamente sobre el tejido complica mucho la ejecución de la técnica, ya que la sonda debe acceder al interior del medio celular e hibridar con su mRNA diana sin interactuar con ningún componente celular presente en el mismo. En este contexto, adquiere especial importancia la especificidad de la señal, es decir, asegurar que la única señal remanente en la célula tras los procesos de lavado procede de sondas realmente hibridadas con sus mRNAs dianas.

Las sondas de RNA *antisense* (o contrasentido) ofrecen una combinación única de ventajas que las hace muy recomendables para su empleo en las técnicas de hibridación *in situ* para la detección de mRNAs específicos (Angerer LM, 1991).

En primer lugar, estas sondas aportan un gran aumento de la sensibilidad debido a la ausencia de fenómenos de competencia por reasociación de la propia sonda. Otra ventaja es la posibilidad de obtener sondas *sense* del mismo cDNA, por lo que son consideradas como el perfecto control negativo frente a señales inespecíficas. Estas señales inespecíficas o *background*, pueden ser reducidas en la medida de lo posible mediante la acción de RNasas bajo condiciones en las cuales los híbridos RNA-RNA sonda-diana son resistente a su digestión, degradándose de este modo todo el exceso de sonda no hibridada. Además, la gran estabilidad de los híbridos RNA-RNA (Casey J y col, 1977) permite unos lavados posthibridación a temperaturas relativamente altas, reducen el riesgo de uniones inespecíficas. Por otro lado, la síntesis *in vitro* de este tipo de sondas permite marcajes a una alta actividad específica (Melton DA y col, 1984).

Básicamente, la técnica de hibridación *in situ* empleada por nosotros se compone de cinco fases secuenciales, tal y como se esquematiza en la *figura 3. 3* (Wilcox JN y col, 1989; Seiffert D y col, 1991; Estellés A y col, 1994 y 1996). Partimos de cortes de tejido embebido en parafina que posteriormente son desparafinados, hidratados, fijados y permeabilizados en una primera fase de tratamientos previos a la hibridación. En una segunda fase, se procede a la hibridación propiamente dicha con la sonda radioactiva. La tercera fase de la técnica se compone de una serie de lavados encaminados a eliminar el exceso de sonda, dentro de la cual se incluye un tratamiento con RNasa y un proceso final de deshidratación de los cortes. La cuarta y quinta fase de este protocolo de hibridación *in situ* corresponden al proceso de autorradiografía y tinción del tejido respectivamente.

Más detalladamente, el protocolo aplicado por nosotros para la detección de los mRNA del PAI-1 es el siguiente:

### 3. 5. 1. PREPARACIÓN DE LOS CORTES

Los bloques de tejido endometrial y endometriósico embebidos en parafina fueron cortados con un microtomo de retracción (Microm) a un espesor nominal de 3  $\mu\text{m}$  y extendidos en un baño a 42°C. Los cortes seriados se colocaron sobre portaobjetos pretratados (Fisher) y se dejaron secar al aire. En este proceso se tomaron todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación con actividades ribonucleasas, como el uso de guantes y el tratamiento con DEPC del agua del baño.

### 3. 5. 2. TRATAMIENTOS PREVIOS A LA HIBRIDACIÓN

#### *Desparafinación*

- 1) Se tratan los cortes en xileno 3 x 5 minutos.

#### *Hidratación*

- 2) Posteriormente se lavan en etanol al 50% en PBS durante 5 minutos.

#### *Fijación*

- 3) Se fijan en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos en hielo.
- 4) Y se lavan 5 minutos en 0.5x SSC.

#### *Permeabilización*

- 5) Los cortes se tratan con proteasa K (Boehringer Mannheim) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  en NaCl 0.5M, Tris 10mM pH 8.0, durante 10 minutos.
- 6) A continuación se lavan con 0.5x SSC dos veces consecutivas durante 10 minutos cada vez.

### 3. 5. 3. HIBRIDACIÓN

- 7) El corte de tejido se prehibrida con 100-300µl de solución de prehibridación (50% formamida, 0.3M NaCl, 20mM Tris pH 8.0, 5mM EDTA, 10% dextran sulfato, 10mM DTT, 1x solución de Denhardt) a 42°C de una a tres horas en una cámara húmeda con 50% formamida, 4x SSC.
- 8) Posteriormente se prepara la mezcla de hibridación de la siguiente manera:
  - Por cada 20µl de mezcla de hibridación,
    - \*1µl de tRNA (10mg/ml)
    - \*volumen de sonda (cRNA marcado con <sup>35</sup>S) para 600.000 cpm
    - \*volumen de agua estéril tratada con DEPC necesario para 3µl.
  - Se añaden alícuotas de 20µl de mezcla de hibridación por cada 100µl de solución de prehibridación.
  - Se hierve durante 3 minutos en baño y se enfría rápidamente añadiendo 17µl de solución de prehibridación mantenida en hielo.
  - Las muestras se mantienen a 55°C una noche dentro de la cámara húmeda.

### 3. 5. 4. LAVADOS

- 9) A continuación se lava en 2x SSC, 2.5mM EDTA dos veces durante 5 minutos.

#### *Tratamiento con RNasa*

- 10) Las muestras se incuban durante 30 minutos con tampón RNasa (0.5M NaCl, 10mM Tris pH 8.0) con 1 ml de RNasa A (*Boehringer Mannheim*) (20mg/ml).
- 11) Se lavan en 2x SSC, 2.5mM EDTA dos veces durante 5 minutos.
- 12) Se lavan en 0.1x SSC, 1mM EDTA con 3.5ml de β-mercaptoetanol a 60°C durante 2 horas en constante agitación.
- 13) Y se lavan en 0.5x SSC cuatro veces durante 10 minutos cada una.

#### *Deshidratación*

- 14) Se deshidratan en etanol al 50% y al 90% que contiene acetato amónico 0.3M durante 2 minutos cada uno. Se dejan secar al aire una noche.

### 3. 5. 5. AUTORRADIOGRAFÍA

#### *Inmersión en la emulsión fotográfica*

- 15) Se funde la emulsión NTB-2 (Kodak) a 42°C durante 45 minutos. Una vez en estado líquido, se diluye 1:1 en agua destilada precalentada a la misma temperatura. Se mantiene en baño a 42°C de 15 a 30 minutos para eliminar las burbujas de la emulsión y proceder después a sumergir en ella las preparaciones durante unos segundos.

#### *Exposición*

- 16) Se dejan secar al aire en posición vertical durante unas 3 horas. Después las preparaciones se guardan en cajas con desecante y se exponen a 4°C durante un período de tiempo que oscila de 2 a 12 semanas.

#### *Revelado*

- 17) Después de dejar atemperar una hora para evitar condensaciones, se incuban las preparaciones en revelador D19 de Kodak durante 2 minutos a 15°C.
- 18) Se lavan en agua 20 segundos para detener el revelado.
- 19) Se incuban 5 minutos en fijador Kodak a 15 °C.
- 20) Y finalmente, se lavan 3 veces con agua durante 5 minutos cada vez.

### 3. 5. 6. TINCIÓN Y MONTAJE

#### *Tinción de núcleos*

- 21) Las preparaciones se tratan 1 minuto con mordiente (25mM NaHCO<sub>3</sub>, 75mM MgSO<sub>4</sub>).
- 22) Se tiñen los núcleos celulares con hematoxilina de Gill 3x (Sigma) durante 2 minutos.
- 23) Se lavan abundantemente con agua.

#### *Tinción de citoplasmas*

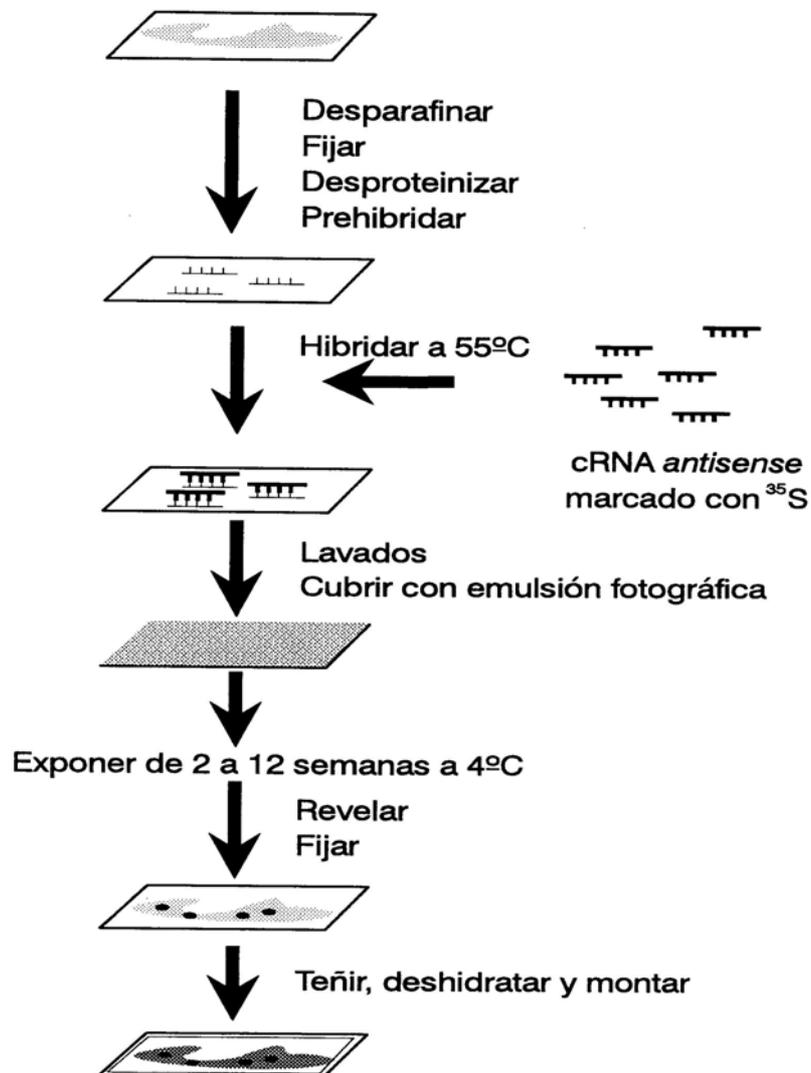
- 24) Las preparaciones se tratan de nuevo con el mordiente durante 1 minuto.
- 25) Se incuban durante 5 minutos con 50% etanol en PBS.
- 26) Se tiñen durante 45 segundos con eosina alcohólica (Sigma).
- 27) Se lavan 4 veces durante 2 minutos cada una en etanol absoluto.
- 28) Y finalmente, se lavan 2 veces durante 5 minutos con el solvente Hemo-De (Fisher).

#### *Montaje*

- 29) Por último, se montan los cubreobjetos con medio de montaje Permount (Fisher).

### 3. 5. 7. MICROSCOPIA

El resultado de todo este proceso es la aparición de unos precipitados de plata metálica sobre el tejido en aquellos lugares donde la emulsión fotográfica ha sido impresionada por la emisión radioactiva procedente de la sonda hibridada. Debido al pequeño diámetro de estos depósitos de plata, la observación de las preparaciones con microscopía óptica convencional sólo permite ver débilmente su señal. Para mejorar el análisis de estos precipitados se recurre al uso de epiluminación en un microscopio de fluorescencia BH-2 RFCA (Olympus), que dispone de un espejo dicróico tipo *immunogold* que permite el paso de luz visible. Este montaje hace brillar intensamente los depósitos de plata que resaltan sobre el fondo, siempre que la luz transmitida a través de la preparación sea lo suficientemente débil.



**Figura 3. 3. Esquema del desarrollo de la técnica de hibridación in situ.** Los cortes de tejido en parafina son pretratados tal y como se describe, e hibridados frente a una sonda radioactiva complementaria de un determinado mRNA. Después de un intenso proceso de lavado se cubren las preparaciones con emulsión fotográfica líquida y se exponen a 4°C durante un periodo de entre 2 y 12 semanas. Posteriormente, se revela la señal y se tiñe el tejido con hematoxilina-eosina para visualizar los detalles histológicos.

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias entre las medias de las variables cuantitativas analizadas en los extractos de tejido de los diferentes grupos clínicos fueron determinadas mediante el test de ANOVA de una vía y test de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls (cuando fue necesario). El test de ANOVA de dos vías se utilizó para detectar la posible interacción entre la presencia de la enfermedad y las fases del ciclo.

Cuando se realizó una comparación entre más de dos grupos se utilizó el test de ANOVA para detectar diferencias significativas, realizando una corrección de Bonferroni para estimar la varianza interna de los grupos. Posteriormente se realizó una prueba t de Student para la comparación de los grupos dos a dos.

La t de Student para datos apareados y el test no paramétrico de Wilcoxon se utilizaron en el subgrupo de 37 pacientes en las cuales se obtuvo simultáneamente muestra de tejido endometriósico y endometrial.

Las diferencias entre las medias de las variables analizadas en el líquido peritoneal se analizaron por las pruebas de t-Student o por U-Mann-Whitney.

Los niveles de significación de las correlaciones entre las variables se calcularon mediante la correlación bivalente de Pearson, correlación parcial y el test de regresión lineal múltiple.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

Todos estos análisis fueron realizados con el paquete estadístico SPSS 10.0 para Windows (*SPSS Inc.*).

## **4.- RESULTADOS**

## **4. 1. SISTEMA FIBRINOLÍTICO EN EXTRACTOS TISULARES**

### **4. 1. 1. ACTIVADORES FIBRINOLÍTICOS**

En el análisis de las muestras observamos que una cantidad significativa de los componentes del sistema fibrinolítico permanecían en el extracto de membrana de los diferentes tejidos estudiados, del endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis y del endometrio control. Por ello, la cuantificación antigénica de dichos componentes se realizó tanto en los extractos de la fracción citosólica como en el conjunto de la fracción citosólica más la fracción de membrana. Sin embargo, tal y como se indica en Material y Métodos, la determinación funcional de los niveles de PAI-1, uPA y tPA se realizó sólo en los extractos citosólicos, ya que la solubilización de las membranas con Tritón X-100 disminuye o bloquea la actividad funcional de estos parámetros.

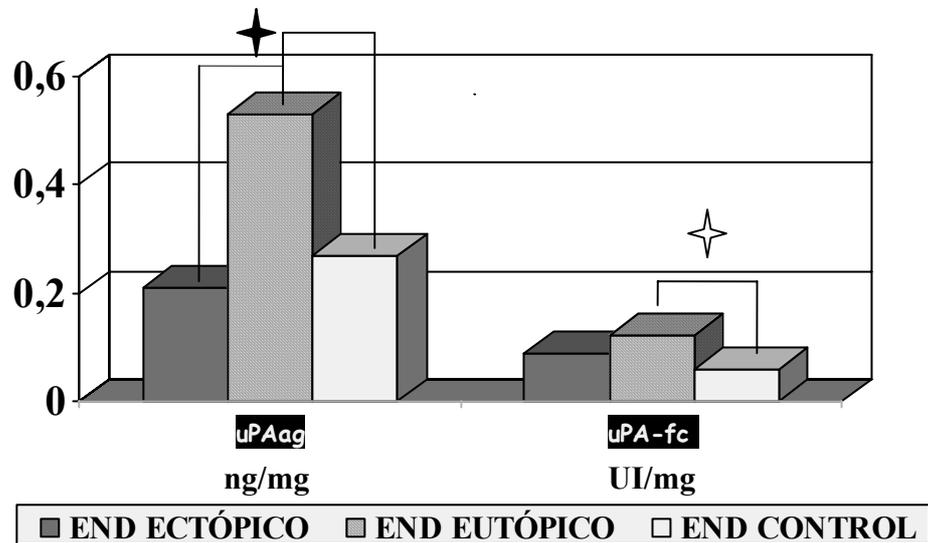
En cuanto a los niveles antigénicos de tPA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados, aunque los valores observados en el endometrio de las mujeres con endometriosis fueron ligeramente superiores que en el tejido endometriósico y el endometrio control. Por otra parte, los niveles funcionales de tPA resultaron ser menores en el tejido endometriósico ( $0,26\pm 0,05$  ng/mg), que en el endometrio control ( $0,60\pm 0,10$  ng/mg) (*Tabla 4. 1*).

En el caso de la uPA comprobamos la presencia de unos niveles antigénicos estadísticamente superiores en el endometrio de mujeres con endometriosis que en el endometrio control (*Tabla 4. 1, Figura 4. 1*), tanto en la fracción citosólica ( $0,53\pm 0,08$  vs  $0,27\pm 0,03$  ng/mg,  $p<0,001$ ), como en el conjunto de la fracción citosólica más la fracción de membrana ( $1,65\pm 0,16$  vs  $1,16\pm 0,08$  ng/mg,  $p<0,05$ ). Los niveles funcionales de uPA también fueron significativamente mayores en el endometrio de mujeres con endometriosis ( $0,12\pm 0,01$  ng/mg), en comparación con el endometrio de los controles ( $0,06\pm 0,001$  ng/mg) ( $p<0,05$ ).

Al estudiar los niveles del uPAR no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados, tanto en la fracción citosólica como en la citosólica más el extracto de membrana (*Tabla 4. 1*).

	TEJIDO ENDOMETRIÓSICO (N=50) (I)	ENDOMETRIO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS (N=37) (II)	ENDOMETRIO DE MUJERES SIN ENDOMETRIOSIS (N=37) (III)	ANOVA	I-II	II-III	I-III
<b>tPA<sub>ag</sub></b> <b>(ng/mg)</b>	2,87±0,23 <sup>a</sup> 9,41±0,63 <sup>b</sup>	3,98±0,35 12,57±1,17	3,88±0,46 9,40±1,32	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS
<b>tPA<sub>fc</sub></b> <b>(U/mg)</b>	0,26±0,05 <sup>a</sup>	0,41±0,06	0,60±0,10	p<0,05	NS	NS	p<0,05
<b>uPA<sub>ag</sub></b> <b>(ng/mg)</b>	0,21±0,02 <sup>a</sup> 1,31±0,13 <sup>b</sup>	0,53±0,08 1,65±0,16	0,27±0,03 1,16±0,08	p<0,001 p<0,05	p<0,001 NS	p<0,001 p<0,05	NS NS
<b>uPA<sub>fc</sub></b> <b>(U/mg)</b>	0,09±0,02 <sup>a</sup>	0,12±0,01	0,06±0,001	p<0,05	NS	p<0,05	NS
<b>uPAR</b> <b>(ng/mg)</b>	<b>R</b> 0,90 0,20 <sup>a</sup> 3,50±0,32 <sup>b</sup>	0,49±0,11 2,54±0,43	0,72±0,09 3,37±0,27	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS

**Tabla 4. 1. Niveles de activadores del plasminógeno en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis.** Los valores de tPA ag, uPA ag y uPAR ag se evaluaron en la fracción citosólica y de membrana y los niveles de tPA y uPA funcional (fc) se determinaron sólo en la fracción citosólica. Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; a) fracción citosólica; b) fracción citosólica más membrana; NS = No significación estadística



**Figura 4. 1.** Niveles de activadores del plasminógeno en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Se evidencia un aumento de los niveles antigénicos y funcionales de uPA en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis. Se han considerado los valores de extracto citosólico para la determinación antigénica de uPA.

✦ Significación estadística ( $p < 0,05$ ). ✦ Significación estadística ( $p < 0,001$ ).

Según lo indicado en el capítulo de Material y Métodos, se estudió la distribución de las fases del ciclo en los grupos clínicos, observándose una distribución similar. Además, no se detectaron interacciones entre las fases del ciclo y los resultados obtenidos en el endometrio de mujeres con o sin endometriosis, usando el test ANOVA de dos vías.

#### 4. 1. 2. INHIBIDORES FIBRINOLÍTICOS

Los niveles antigénicos y funcionales de PAI-1, así como niveles antigénicos de PAI-2, de PAI-3 y de los complejos tPA:PAI-3 y uPA:PAI-3 se determinaron en los extractos tisulares de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (*Tabla 4. 2*).

El tejido endometriósico mostró un nivel de PAI-1ag aumentado en el conjunto del extracto citosólico y de membrana ( $10,65 \pm 1,73$  ng/mg), en comparación con el endometrio de mujeres con endometriosis ( $2,75 \pm 0,80$  ng/mg) y el endometrio control ( $1,62 \pm 0,42$  ng/mg) (*Tabla 4. 2, Figura 4. 2*). Se obtuvieron diferencias similares entre los grupos al valorar los niveles de PAI-1ag en la fracción citosólica. En relación a los niveles de PAI-1fc, también se observó un aumento en el tejido endometriósico, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (*Tabla 4. 2*).

En cuanto a los valores de PAI-3ag, obtuvimos niveles significativamente menores ( $p < 0,01$ ) en el tejido endometriósico ( $179 \pm 12$  ng/mg) que en el endometrio control ( $338 \pm 42$  ng/mg) (*Tabla 4. 2, Figura 4. 2*).

Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados en relación a los niveles de PAI-2ag, ni en relación a los complejos uPA:PAI-3 o tPA:PAI-3 (*Tabla 4. 2*).

	TEJIDO ENDOMETRIÓSSICO (N=50) (I)	ENDOMETRIO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS (N=37) (II)	ENDOMETRIO DE MUJERES SIN ENDOMETRIOSIS (N=37) (III)	ANOVA	I-II	II-III	I-III
<b>PAI-1ag (ng/mg)</b>	2,95 1,73 <sup>b</sup>	0,71±0,15 2,75±0,80	0,75±0,19 1,62±0,42	p<0,001 p<0,001	p<0,001 p<0,001	NS NS	p<0,001 p<0,001
<b>PAI-1fc (U/mg)</b>	2,42±0,56 <sup>a</sup>	1,96±0,16	0,93±0,23	NS	NS	NS	NS
<b>PAI-2 ag (ng/mg)</b>	5,75±0,99 <sup>a</sup> 6,86±1,12 <sup>b</sup>	7,04±2,23 10,23±2,47	4,12±1,69 4,70±1,77	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS
<b>PAI-3 ag (ng/mg)</b>	54±6 <sup>a</sup> 179±12 <sup>b</sup>	80±14 222±33	122±16 338±42	p<0,01 p<0,01	NS NS	NS NS	p<0,01 p<0,01
<b>tPA:PAI-3 (ng/mg)</b>	0,02±0,01 <sup>a</sup> 0,02±0,01 <sup>b</sup>	0,16±0,09 0,20±0,10	0,03±0,02 0,06±0,02	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS
<b>uPA:PAI-3 (ng/mg)</b>	0,27±0,15 <sup>a</sup> 0,28±0,14 <sup>b</sup>	0,27±0,013 0,27±0,13	0,23±0,10 0,36±0,18	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS

Tabla 4. 2. Niveles de los inhibidores fibrinolíticos en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Los valores de PAI-1, -2 y -3 ag se evaluaron en la fracción citosólica (a) y de membrana (b) y los niveles de PAI-1fc se determinaron sólo en la fracción citosólica (a). Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; NS = No significación estadística.

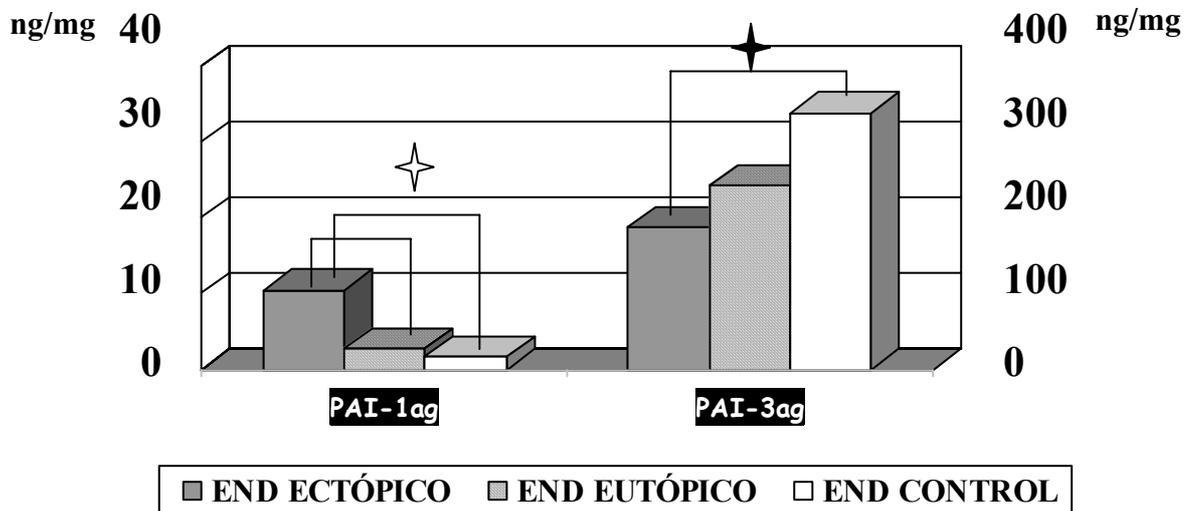


Figura 4. 2. Niveles de los inhibidores fibrinolíticos en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Se evidencia un aumento de los niveles de PAI-1ag estadísticamente significativo  $\star$  ( $p<0,001$ ) en el endometrio ectópico de las mujeres con endometriosis en comparación con el endometrio eutópico y control. Los niveles de PAI-3ag eran significativamente menores en el tejido endometriósico que en el endometrio control. Se han considerado los valores de extracto total (citosólico + membrana)  $\star$  ( $p<0,01$ ).

## **4. 2. SISTEMA DE LAS METALOPROTEASAS EN EXTRACTOS TISULARES**

Al igual que para los componentes del sistema fibrinolítico, los niveles antigénicos de MMP-3 y TIMP-1 fueron determinados en los extractos tisulares del tejido endometriósico y del endometrio de mujeres con y sin endometriosis (*Tabla 4. 3, Figura 4. 3*).

En el caso de la MMP-3 se evidenciaron unos valores elevados en el conjunto del extracto citosólico y de membrana del endometrio de mujeres con endometriosis ( $4,00\pm 0,49$  ng/mg) en comparación con el tejido endometriósico ( $2,93\pm 0,55$  ng/mg) y el endometrio de mujeres con endometriosis ( $2,18\pm 0,35$  ng/mg). Además, los niveles de MMP-3 en el extracto citosólico del endometrio de mujeres con la enfermedad ( $1,77\pm 0,40$  ng/mg), fueron significativamente más altos que en el endometrio de los controles ( $0,69\pm 0,14$  ng/mg) (*Tabla 4. 3, Figura 4. 3*).

En cuanto a los valores de TIMP-1, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, con niveles muy superiores en el tejido endometriósico ( $94\pm 4$  ng/mg) en comparación con el endometrio de mujeres con endometriosis ( $32\pm 4$  ng/mg) y en el endometrio de los controles ( $31\pm 3$  ng/mg). Se observaron cambios similares, también con significación estadística, en los niveles de TIMP- 1 al analizar por separado la fracción citosólica de los extractos tisulares (*Tabla 4. 3*).

	Tejido endometriósico (n=50) (I)	Endometrio de mujeres con endometriosis (n=37) (II)	Endometrio de mujeres sin endometriosis (n=37) (III)	ANOVA	I-II	II-III	I-III
<b>MMP-3<sub>ag</sub></b> <b>(ng/mg)</b>	0,76±0,13 <sup>a</sup>	1,77±0,40	0,69 ±0,14	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NS
	2,93±0,55 <sup>b</sup>	4,00 ±0,49	2,18±0,35	p<0,05	NS	p<0,05	NS
<b>TIMP-1<sub>ag</sub></b> <b>(ng/mg)</b>	29±4 <sup>a</sup>	17±3	15±2	p<0,001	p<0,01	NS	p<0,001
	94±4 <sup>b</sup>	32±4	31±3	p<0,01	p<0,01	NS	p<0,001

Tabla 4. 3. Niveles antigénicos de MMP-3 y TIMP-1 en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; a) fracción citosólica; b) fracción citosólica más membrana; NS = No significación estadística.

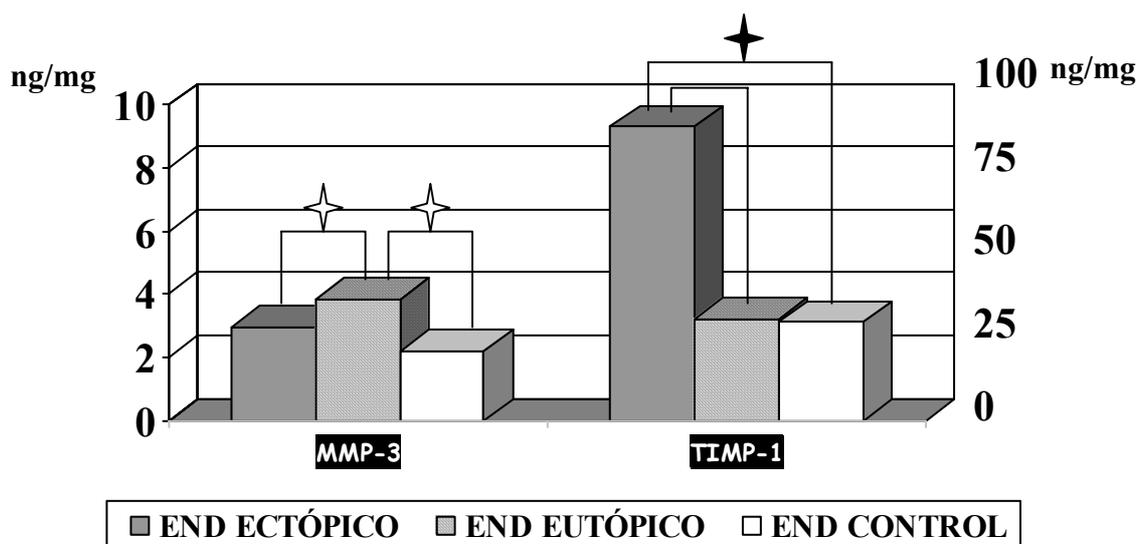


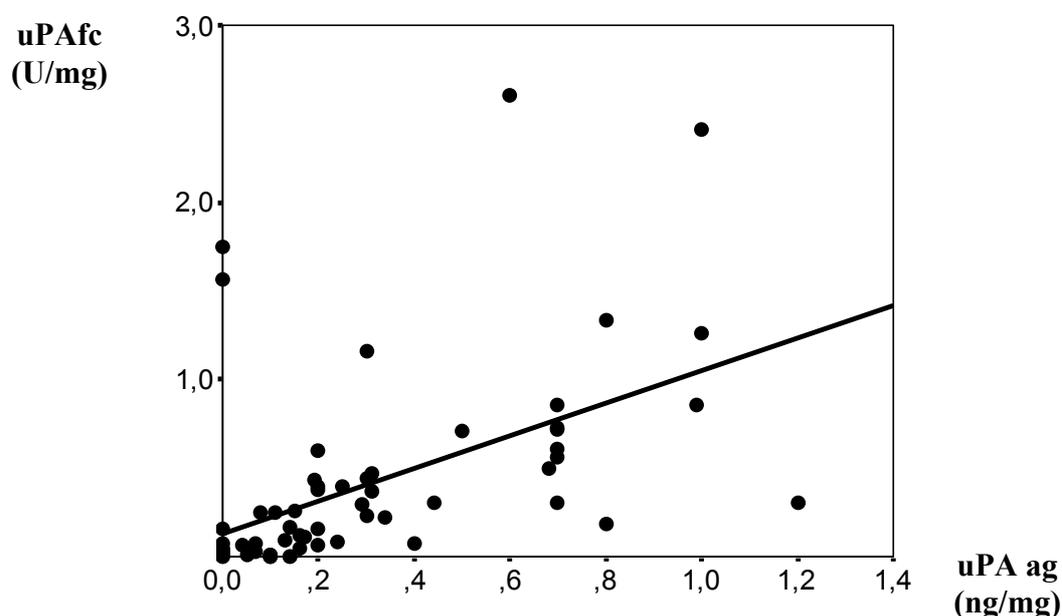
Figura 4. 3. Niveles antigénicos de MMP-3 y TIMP-1 en extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Se han considerado los valores del extracto total. Las diferencias fueron estadísticamente significativas (☆  $p < 0,05$ ; ★  $p < 0,01$ ).

## 4. 3. CORRELACIONES EN EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS METALOPROTEASAS

### 4. 3. 1. CORRELACION ENTRE LOS NIVELES ANTIGÉNICOS Y FUNCIONALES

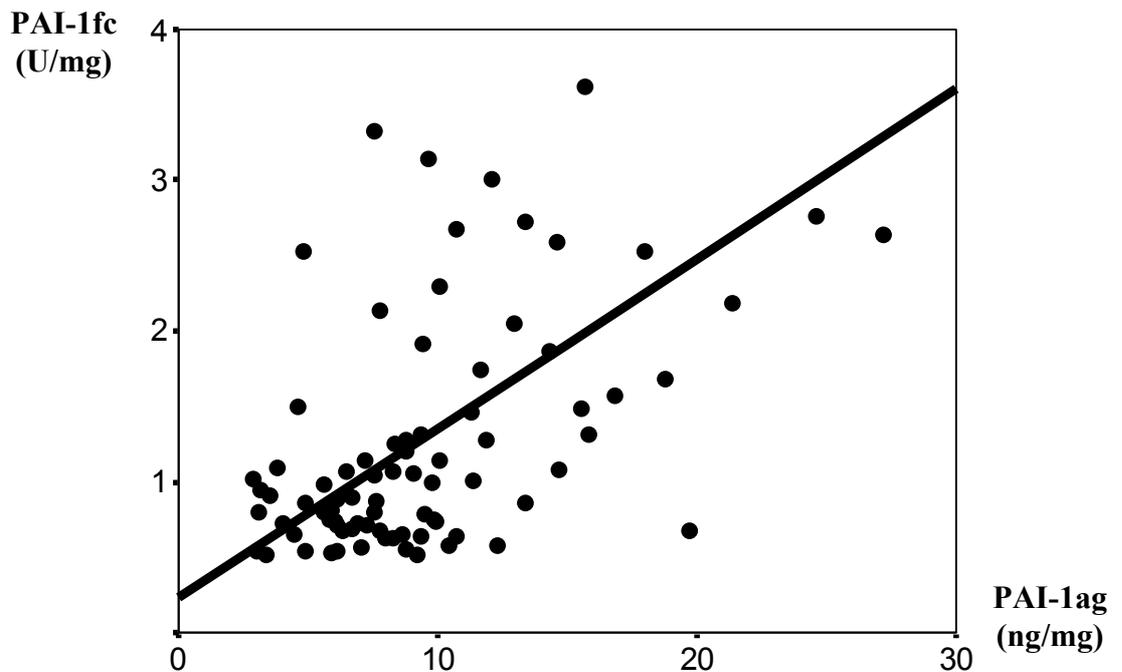
Cuando se analiza la relación entre los niveles de tPAag y tPAfc en la fracción citosólica del endometrio de mujeres con y sin endometriosis existe una correlación positiva. Aunque esta relación directa está presente en todas las muestras estudiadas y es estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ) la correlación obtenida es débil ( $r = 0,365$ ).

También se evidencia una correlación positiva entre los niveles de uPAag y uPAfc en la fracción citosólica de extractos de tejido endometrial de mujeres con endometriosis y controles (*Figura 4. 4*). La correlación es ligeramente superior a la observada para el tPA ( $r = 0,509$ ) con una significación estadística de  $p < 0,001$ .



*Figura 4. 4. Correlación entre los niveles de uPA antigénico y funcional en la fracción citosólica de extractos de endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Se observa una correlación positiva ( $r = 0,509$ ) estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).*

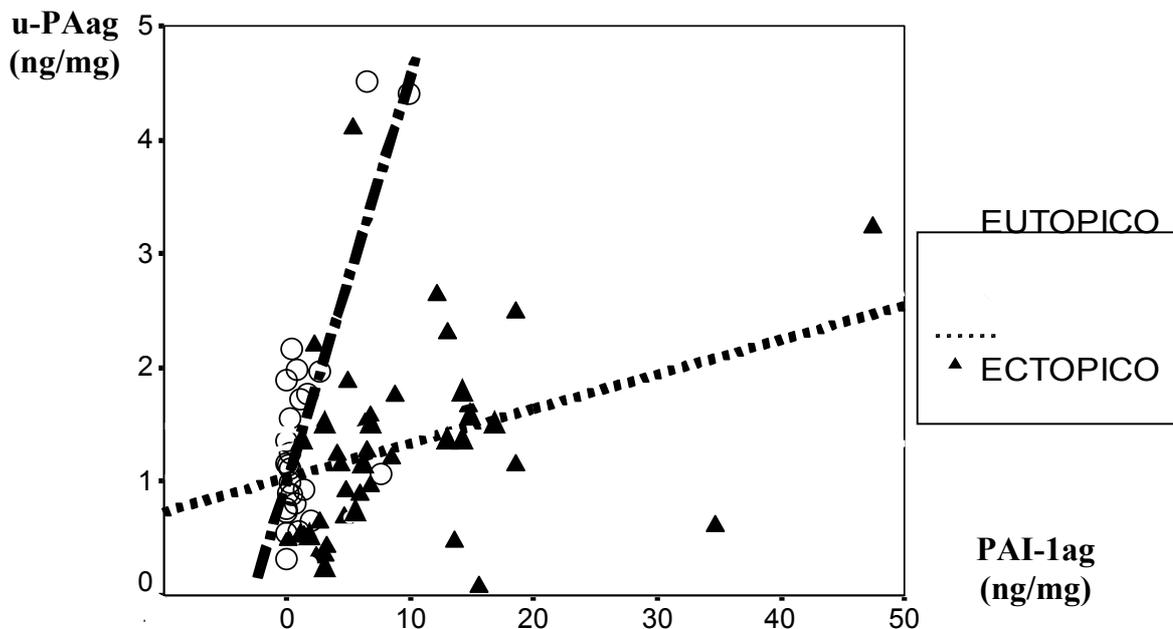
En la *figura 4. 5* se presenta la correlación entre los niveles de PAI-1fc y PAI-1ag en la fracción citosólica. Se demuestra la existencia de una correlación positiva intermedia entre los niveles de PAI-1 antigénico y funcional en el tejido endometriósico y en el endometrio de mujeres con y sin endometriosis y ( $r=0,552$ ,  $p<0,0001$ ). Por ello podemos afirmar que, aunque los cambios observados en el tejido endometriósico corresponden PAI-1ag, existe una correlación en las muestras observadas con el componente funcional de dicha proteína. Así pues, el balance global en el tejido endometriósico sería un aumento de la expresión proteica de PAI-1, que se traduciría en una mayor inhibición de la actividad proteolítica.



*Figura 4. 5. Correlación entre los niveles de PAI-1 antigénico y funcional en fracción citosólica extractos de tejido endometriósico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Se observa una correlación positiva ( $r= 0,552$ ) estadísticamente significativa ( $p< 0,0001$ ).*

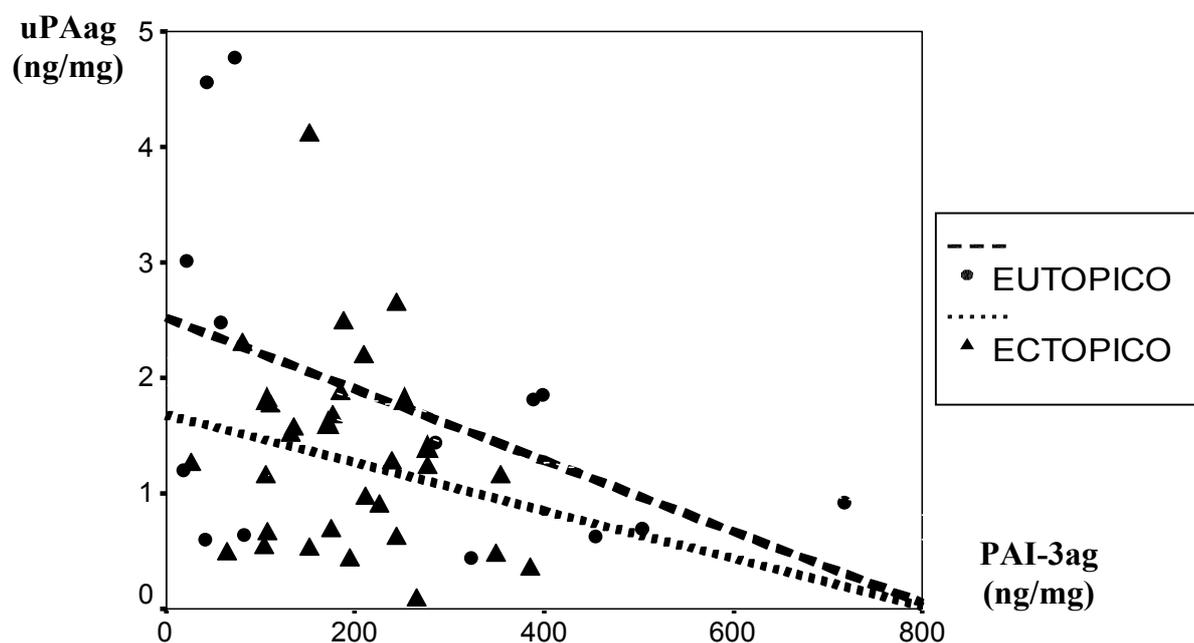
### 4. 3. 2. CORRELACION ENTRE ACTIVADORES E INHIBIDORES

La representación gráfica de la relación entre los niveles de uPA ag y de PAI-1 ag (Figura 4. 6) refleja el distinto perfil fibrinolítico presente en el endometrio de mujeres con endometriosis. El PAI-1 actúa como inhibidor de la uPA, con quien mantiene una correlación positiva buena en el endometrio control ( $r= 0,741$ ;  $p< 0,0001$ ) y algo más débil en el tejido endometriósico ( $r= 0,328$ ;  $p<0,05$ ). Sin embargo, el endometrio de las mujeres con endometriosis tiene un comportamiento diferente ya que no existe correlación entre el PAI-1ag y la uPAag, de manera que un aumento de los niveles de esta última no se correspondería con un aumento de su inhibidor y resulta en un balance proteolítico positivo.



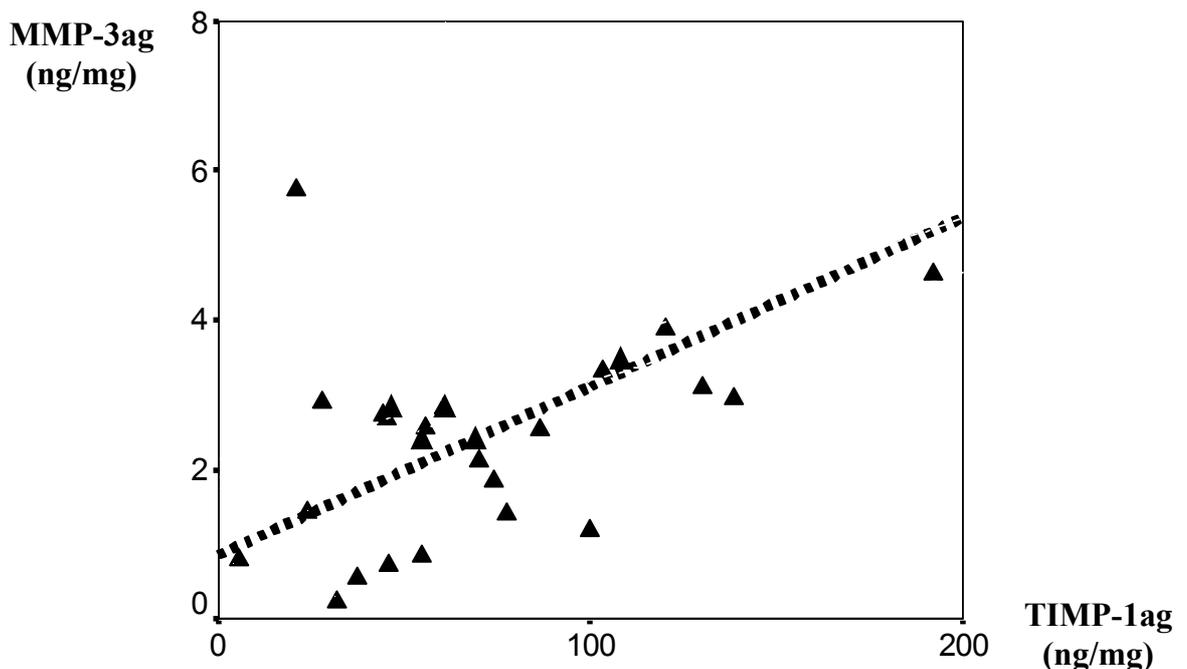
*Figura 4. 6. Correlación entre los niveles antigénicos de uPA y PAI-1 en extractos de endometrio ectópico de mujeres con endometriosis y endometrio control. Se observa una correlación positiva de ambos parámetros en el endometrio control ( $r = 0,741$ ;  $p< 0,0001$ ) y en el tejido endometriósico ectópico ( $r = 0,328$ ;  $p< 0,05$ ).*

Al estudiar la relación entre los niveles antigénicos de uPA y de PAI-3 (*Figura 4. 7*), se observa la existencia de una correlación negativa débil entre ambos parámetros en las muestras de tejido endometriósico ( $r = -0,206$ ;  $p < 0,05$ ) y una correlación negativa intermedia en el endometrio de mujeres con endometriosis ( $r = -0,495$ ;  $p < 0,05$ ). Esta correlación no se encuentra en las muestras de tejido endometrial de mujeres controles.



*Figura 4. 7. Correlación entre los niveles antigénicos de uPA y PAI-3 en extractos de endometrio ectópico y eutópico de mujeres con endometriosis. Se observa una correlación negativa de ambos parámetros en el endometrio eutópico ( $r = -0,495$ ;  $p < 0,05$ ) y en el tejido endometriósico ectópico ( $r = -0,206$ ;  $p < 0,05$ ).*

La relación entre la MMP-3 y su inhibidor TIMP-1, es un buen reflejo del balance activador:inhibidor, dentro del sistema de las metaloproteasas. Al estudiar la relación entre los niveles antigénicos de MMP-3 y TIMP-1 (*Figura 4. 8*), se observa la existencia de una correlación positiva de ambos parámetros únicamente en las muestras de tejido endometriósico ectópico ( $r= 0,647$ ;  $p<0,001$ ). Esta correlación no se observa en el endometrio de localización eutópica de mujeres con endometriosis. Hay que tener en cuenta que se ha determinado la fracción libre de MMP-3 y la fracción libre y acomplejada de TIMP-1. Así pues, estos datos sugieren que un aumento de los niveles de MMP-3 en el tejido endometriósico, podría verse compensado por un incremento de TIMP-1 que al formar complejos 1:1 con dicha proteasa produciría su inactivación.



*Figura 4. 8. Correlación entre los niveles antigénicos de MMP-3 y TIMP-1 en extractos de endometrio ectópico de mujeres con endometriosis. Se observa una correlación positiva de ambos parámetros en el endometrio ectópico ( $r= 0,647$ ;  $p< 0,001$ ).*

#### 4. 3. 4. MUESTRAS APAREADAS EN LAS MUJERES CON ENDOMETRIOSIS

En 37 de las 50 mujeres con endometriosis, se obtuvieron muestras de endometrio y tejido endometriósico ectópico simultáneamente. Las muestras recogidas en una misma paciente permiten la obtención de datos apareados, que son fácilmente comparables y eliminan factores externos de confusión. En este subgrupo de 37 pacientes, se confirmaron los resultados obtenidos en el grupo total. Así, por ejemplo, en el tejido endometriósico se observaron unos niveles de PAI-1ag significativamente mayores ( $11,57 \pm 2,39$  ng/mg) en comparación con el endometrio eutópico ( $2,75 \pm 0,80$  ng/mg). Se comprobó la existencia de cambios similares para el TIMP-1ag. Los niveles antigénicos de TIMP-1ag también fueron mayores en el tejido endometriósico ( $111 \pm 21$  ng/mg) que el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis ( $32 \pm 4$  ng/mg) (Tabla 4. 4).

	TEJIDO ENDOMETRIÓSICO	ENDOMETRIO	Significación estadística
<b>u-PAag</b> (ng/mg)	$0,20 \pm 0,02$ <sup>a</sup>	$0,53 \pm 0,08$	$p < 0,01$
	$1,24 \pm 0,13$ <sup>b</sup>	$1,65 \pm 0,16$	NS
<b>PAI-1ag</b> (U/mg)	$3,26 \pm 0,69$ <sup>a</sup>	$0,71 \pm 0,15$	$p < 0,01$
	$11,57 \pm 2,39$ <sup>b</sup>	$2,75 \pm 0,80$	$p < 0,01$
<b>TIMP-1 ag</b> (ng/mg)	$35 \pm 6$ <sup>a</sup>	$17 \pm 3$	$p < 0,05$
	$111 \pm 21$ <sup>b</sup>	$32 \pm 4$	$p < 0,01$

*Tabla 4. 4. Niveles de uPA ag, PAI-1 ag y TIMP-1 ag de las muestras apareadas en las mujeres con endometriosis. En 37 mujeres con endometriosis se obtuvo simultáneamente muestra de endometrio eutópico y ectópico. Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; a) fracción citosólica; b) fracción citosólica más membrana; NS = No significación estadística.*

#### **4. 4. SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS METALOPROTEASAS EN FUNCIÓN DE LA RECIDIVA DE LA ENDOMETRIOSIS**

Se realizó un seguimiento evolutivo de las pacientes con endometriosis para identificar los casos en los que se producía una recidiva de la endometriosis tras el tratamiento (n=13). En todas ellas se realizó una nueva intervención quirúrgica tras el diagnóstico clínico y ecográfico de sospecha de recidiva y se confirmó el diagnóstico de endometriosis recidivante con el estudio anatomopatológico. Por motivos éticos, aquellas mujeres que no refirieron clínica sospechosa de recidiva (n=24), sólo fueron controladas con un seguimiento clínico, ecográfico y bioquímico sin confirmación directa de la ausencia de recidiva.

Se estudiaron los niveles de los activadores fibrinolíticos en el tejido endometrial en función de la existencia de recidiva de enfermedad. No se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos que pudieran sugerir la existencia de variaciones en la actividad proteolítica como justificación del diferente comportamiento evolutivo de la enfermedad (*Tabla 4. 5*).

	<b>NO RECIDIVA (n=24)</b>	<b>RECIDIVA DE ENFERMEDAD (n=13)</b>	<b>Significación estadística</b>
<b>tPA<sub>ag</sub> (ng/mg)</b>	3,63±0,84 <sup>a</sup> 10,82±2,36 <sup>b</sup>	4,04±0,43 12,80±2,68	NS NS
<b>tPA<sub>fc</sub> (U/mg)</b>	0,44±0,12 <sup>a</sup>	0,33±0,27	NS
<b>uPA<sub>ag</sub> (ng/mg)</b>	0,58±0,18 <sup>a</sup> 1,90±0,52 <sup>b</sup>	0,59±0,22 1,18±0,14	NS NS
<b>uPA<sub>fc</sub> (ng/mg)</b>	0,11±0,03 <sup>a</sup>	0,10±0,03	NS
<b>uPA-R (ng/mg)</b>	0,61±0,36 <sup>a</sup> 3,29±1,87 <sup>b</sup>	0,64±0,41 2,92±0,73	NS NS

*Tabla 4. 5. Niveles de activadores del plasminógeno en extractos de endometrio de mujeres con endometriosis en función de la recidiva clínica. No se observan diferencias significativas en los parámetros estudiados entre ambos grupos. Los datos se expresan como X ± EEM; a) fracción citosólica; b) fracción citosólica más membrana; NS = No significación estadística*

Se analizó el comportamiento de los inhibidores del sistema fibrinolítico en función de la existencia de recidiva de la endometriosis. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos que pudieran reflejar un estado de inhibición proteolítica distinto en función del curso clínico de la enfermedad (Tabla 4. 6).

	NO RECIDIVA (n=24)	RECIDIVA DE ENFERMEDAD (n=13)	Significación estadística
<b>PAI-1<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	0,79±0,28 <sup>a</sup>	0,40±0,19	NS
	3,72±2,08 <sup>b</sup>	1,71±0,30	NS
<b>PAI-1<sub>fc</sub></b> (U/mg)	1,38±0,86 <sup>a</sup>	1,50±0,50	NS
<b>PAI-2<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	4,91±2,63 <sup>a</sup>	16,39±8,41	NS
	8,66±4,17 <sup>b</sup>	20,63±10,78	NS
<b>PAI-3<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	87±29 <sup>a</sup>	82±37	NS
	263±70 <sup>b</sup>	258±116	
<b>uPA:PAI-3</b> (ng/mg)	0,21±0,10 <sup>a</sup>	0,15±0,08	NS
	0,23±0,10 <sup>b</sup>	0,20±0,09	NS

*Tabla 4. 6. Niveles de inhibidores fibrinolíticos en extractos de endometrio de mujeres con endometriosis en función de la recidiva clínica. No se observan diferencias significativas en los parámetros estudiados entre ambos grupos. Los datos se expresan como X ± EEM; a) fracción citosólica; b) fracción citosólica más membrana; NS = No significación estadística.*

El análisis de la expresión de la MMP-3 y el TIMP-1 se realizó, al igual que con los parámetros del sistema fibrinolítico, en función de la recidiva clínica de la enfermedad. La expresión de estos componentes del sistema de las metaloproteasas fue similar en los dos grupos estudiados, tanto en la fracción citosólica como en la fracción total de proteína (*Tabla 4. 7*).

	NO RECIDIVA (n=24)	RECIDIVA DE LA ENFERMEDAD (n=13)	Significación estadística
<b>MMP-3<sub>ag</sub></b> <b>(ng/mg)</b>	0,84±0,22 <sup>a</sup>	0,68±0,20	NS
	4,25±2,25 <sup>b</sup>	3,39±0,75	NS
<b>TIMP-1<sub>ag</sub></b> <b>(ng/mg)</b>	18±6 <sup>a</sup>	21±8	NS
	38±13 <sup>b</sup>	38±8	NS

*Tabla 4. 7. Niveles de MMP-3 y TIMP-1 en extractos de endometrio eutópico de mujeres con endometriosis en función de la recidiva de la enfermedad. Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; a) fracción citosólica; b) fracción citosólica más membrana; NS = No significación estadística.*

## **4. 5. SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS METALOPROTEASAS EN OTROS EXTRACTOS TISULARES Y EN EL LÍQUIDO PERITONEAL**

### **4. 5. 1. TEJIDO OVÁRICO**

Las muestras de tejido endometriósico provenían de biopsias de endometriomas ováricos que se habían obtenido tras una quistectomía durante el procedimiento quirúrgico o habían sido separadas microscópicamente del tejido ovárico tras la extirpación del anexo. Se intentó valorar la posible interferencia en los resultados de una contaminación de la muestra de endometriosis por tejido ovárico no identificado correctamente como tal. Para ello se realizaron cinco biopsias de parénquima ovárico obtenido de las piezas de anexectomía en las que se analizaron los diferentes componentes del sistema fibrinolítico y de las MMPs.

La cuantificación de los activadores no mostró diferencias que pudieran interferir en los resultados observados. Los valores de la uPAag en tejido ovárico ( $0,37\pm 0,20$  ng/ml), fueron muy inferiores a los observados en el tejido endometriósico ( $1,31\pm 0,13$  ng/ml). Los niveles de MMP-3 fueron también mucho menores ( $0,06\pm 0,02$  ng/ml) que los obtenidos en el tejido endometriósico de las pacientes ( $2,93\pm 0,55$  ng/ml).

Al estudiar los niveles de inhibidores en el tejido ovárico tampoco se evidenciaron valores que pudieran influir en las determinaciones en los extractos de las muestras consideradas en el estudio. El nivel de PAI-1ag en el tejido ovárico ( $0,53\pm 0,18$  ng/ml) fue muy inferior al observado en el endometrio ectópico ( $10,65\pm 1,73$  ng/ml). Del mismo modo, los valores de TIMP-1ag en el ovario ( $23,6\pm 8,95$  ng/ml) fueron bajos comparados con el tejido endometriósico ectópico ( $94\pm 4$  ng/ml). Así pues, la posible contaminación por tejido ovárico de la muestra de endometrioma, influiría a la baja en el nivel de TIMP-1 y PAI-1 detectados. Este hecho no modificaría los resultados observados, consistentes en un aumento significativo de estos inhibidores en el tejido endometriósico.

#### 4. 5. 2. IMPLANTES PERITONEALES

Se identificaron cinco mujeres con endometriosis inicial (estadios I-II de la clasificación revisada AFS, AFSr) en las que se obtuvo muestra de implantes endometriósicos peritoneales y de endometrio. Se realizó una confirmación histológica de la presencia de endometriosis en todas las lesiones peritoneales identificadas en el examen intraoperatorio.

A continuación, se realizó un análisis preliminar de los niveles antigénicos de los componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas. Se estudiaron minuciosamente aquellos parámetros en los que se habían detectado previamente diferencias en las muestras de tejido de pacientes con endometriosis avanzada.

Los niveles de uPAag fueron mayores en los implantes endometriósicos (estadios I-II) ( $2,08 \pm 0,65$  ng/mg) que en los endometriomas (estadios III-IV) ( $1,31 \pm 0,13$  ng/mg) (*Tabla 4. 8*). Sin embargo, los niveles de PAI-1ag fueron inferiores en los implantes endometriósicos ( $1,21 \pm 0,72$  ng/mg) que en los endometriomas ( $10,65 \pm 1,73$  ng/mg) (*Tabla 4. 8*). Este hallazgo es congruente con la existencia de una mayor actividad proteolítica en los estadios precoces de la enfermedad

Cuando se comparan los resultados en el endometrio de los diferentes grupos, se observa que los niveles de uPAag fueron mayores en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis inicial (estadios I-II) ( $2,83 \pm 1,68$  ng/mg) que en el endometrio de las pacientes con enfermedad avanzada (estadios III-IV) ( $1,65 \pm 0,16$  ng/mg) y en el endometrio control ( $1,16 \pm 0,08$  ng/mg) (*Tabla 4. 9*).

	IMPLANTE ENDOMETRIÓICO (n=5)	ENDOMETRIOMA OVÁRICO (n=50)	Significación estadística
<b>uPA<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	2,08±0,65	1,31±0,13	NS
<b>PAI-1<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	1,21±0,72	10,65±1,73	NS
<b>PAI-3<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	160±78	179±12	NS
<b>MMP-3<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	3,13±0,32	2,93±0,55	NS
<b>TIMP-1<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	90±3	94±4	NS

**Tabla 4. 8. Niveles de componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas en las muestras de tejido endometriótico: Implantes peritoneales (estadios I-II de la AFSr) vs endometrioma ovárico (estadios III-IV de la AFSr). Se observa un aumento en los niveles de uPA<sub>ag</sub> en los implantes endometrióticos. Existe además un nivel menor de PAI-<sub>ag</sub> en los implantes endometrióticos. Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; NS = No significación estadística.**

	Endometrio control (n=37)	Endometrio de endometriosis I-II (n=5)	Endometrio de endometriosis III-IV (n=37)	ANOVA	I-II vs Control	I-II vs III-IV	III-IV vs Control
<b>uPA<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	1,16±0,08	2,83±1,68	1,65±0,16	<0,02	<0,001	<0,02	NS
<b>PAI-1<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	1,62±0,42	1,40±0,55	2,75±0,80	NS	NS	NS	NS
<b>PAI-3<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	338±142	317±145	222±33	NS	NS	NS	NS
<b>MMP-3<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	2,18±0,35	3,36±1,05	4,00±0,49	NS	NS	NS	<0.05
<b>TIMP-1<sub>ag</sub></b> (ng/mg)	31±3	14±3	32±4	NS	NS	NS	NS

**Tabla 4. 9. Niveles de componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis en función del estadio (estadios I-II vs III-IV de la AFSr). Se observa un aumento en los niveles de uPA<sub>ag</sub> en el endometrio de las pacientes con endometriosis estadios I-II que en el endometrio de mujeres con estadios más avanzado de la enfermedad y en el endometrio control. Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; NS = No significación estadística.**

### 4. 5. 3. LÍQUIDO PERITONEAL

Los niveles de los diferentes parámetros fibrinolíticos en el líquido peritoneal se muestran en la *Tabla 4. 10*. La concentración total de proteína en dichas muestras fue similar en las mujeres con y sin endometriosis.

El líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis mostró un mayor nivel de uPAag ( $1,89\pm 0,22$  ng/ml) en comparación con los controles ( $1,09\pm 0,15$  ng/ml). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los demás parámetros estudiados. Estos hallazgos sugieren que existe un aumento de la actividad proteolítica en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis

Al estudiar los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc en el líquido peritoneal, se observan valores cuantitativamente mayores en las mujeres con endometriosis que en los controles. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, probablemente debido a la menor cantidad de muestras de líquido peritoneal en el grupo control.

	Mujeres con endometriosis (n=29)	Mujeres sin endometriosis (n=13)	Significación estadística
<b>Proteína total (mg/ml)</b>	37,8±3,2	37,6±4,1	NS
<b>PAI-1<sub>ag</sub> (ng/ml)</b>	21,7±3,7	13,5±6,0	NS
<b>PAI-1<sub>fc</sub> (U/ml)</b>	2,8±1,5	0,4±0,2	NS
<b>PAI-2<sub>ag</sub> (ng/ml)</b>	3,8±0,8	4,9±1,6	NS
<b>PAI-3<sub>ag</sub> (ng/ml)</b>	1677±225	970±252	NS
<b>tPA<sub>ag</sub> (ng/ml)</b>	19,2±2,0	28,1±6,6	NS
<b>tPA<sub>fc</sub> (U/ml)</b>	0,04±0,01	0,10±0,04	NS
<b>uPA<sub>ag</sub> (ng/ml)</b>	1,89±0,22	1,09±0,15	p<0,05
<b>MMP-3<sub>ag</sub> (ng/ml)</b>	86±33	71±12	NS
<b>TIMP-1<sub>ag</sub> (ng/ml)</b>	1537±174	1585±269	NS

*Tabla 4. 10. Parámetros fibrinolíticos y de las MMPs en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis. Los datos se expresan como  $X \pm EEM$ ; NS = No significación estadística.*

## **4. 6. INMUNOHISTOQUIMIA**

Las técnicas de inmunohistoquímica se han aplicado a los componentes del sistema fibrinolítico en los que se observaron variaciones entre los diferentes extractos titulares. De esta manera se pretende localizar el lugar exacto de expresión de cada proteína en el tejido estudiado, así como analizar la existencia de posibles variaciones de su expresión según el momento del ciclo que no hubieran sido detectadas por técnicas cuantitativas.

Las *figuras 4. 9 a 4. 17* muestran los resultados obtenidos al emplear las técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra las proteínas del sistema fibrinolítico o relacionadas con él. La detección de un antígeno específico ocasiona la aparición de un precipitado de color entre rojo oscuro y marrón en la zona donde se localiza, mientras que la tinción del tejido con hematoxilina colorea los núcleos de color azul.

### **4. 6. 1. ENDOMETRIO DE MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS**

En la *figura 4. 9* se puede observar el resultado obtenido al emplear un anticuerpo anti-uPA en el endometrio de mujeres sin endometriosis. El *panel A* de la *figura 4. 9* muestra el resultado de utilizar como primer anticuerpo una IgG preinmune sobre el endometrio de una mujer con endometriosis. Este procedimiento permite calibrar en el tejido analizado el grado de unión inespecífica del segundo anticuerpo, que en definitiva es el responsable de la aparición de la señal. El control aparece libre de señales inespecíficas. En los *paneles B y C* de la *figura 4. 9* se observa una débil señal de uPA en el tejido endometrial, tanto en su componente glandular como estromal.

En la *figura 4. 10* se evidencia una mayor expresión por inmunohistoquímica de la uPA sobre las glándulas endometriales de endometrio de mujeres con endometriosis. El tejido endometrial de estas mujeres muestra una intensa señal positiva fundamentalmente en el epitelio de las glándulas endometriales.

El análisis de la señal de uPA mediante técnicas inmunohistoquímicas en función de la fase del ciclo se presenta en las *figuras 4. 11 y 4. 12*. La autenticidad de esta señal ha sido corroborada, de nuevo, con el empleo sistemático de controles con IgGs no inmunes (*Figuras 4. 11 y 4. 12, Panel A*).

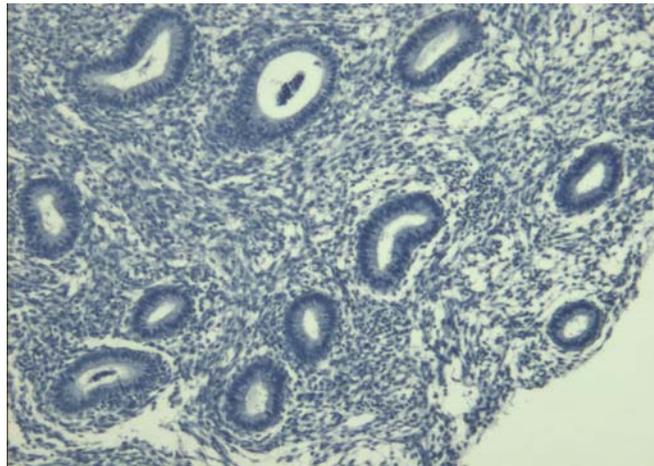
El endometrio proliferativo presenta una arquitectura glandular simple, con predominio del tejido estromal. El análisis por inmunohistoquímica del tejido muestra una señal de moderada intensidad de uPA a nivel del epitelio glandular con una señal focal a nivel del estroma endometrial (*Figura 4. 11*).

El estudio del tejido endometrial en la fase secretora pone de manifiesto un predominio del componente glandular con una organización glandular tortuosa y un plegamiento interno de sus células. Se evidencia una señal intensa de uPA en las células epiteliales de las glándulas endometriales (*Figura 4. 12*).

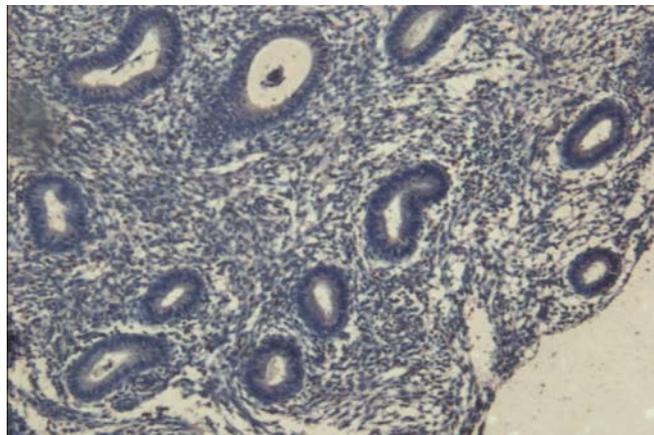
En las *figuras 4. 13 y 4. 14* se pueden observar los resultados obtenidos al emplear un anticuerpo anti-PAI-1 en el endometrio de mujeres control y el endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis.

La *figura 4. 13* muestra el endometrio de mujer sin endometriosis. Se utiliza un control negativo (*Panel A*) para descartar la presencia de señales inespecíficas. Se observa una señal débil difusa de PAI-1 en el componente estromal y glandular del tejido endometrial de la mujer sin endometriosis (*Panel B*).

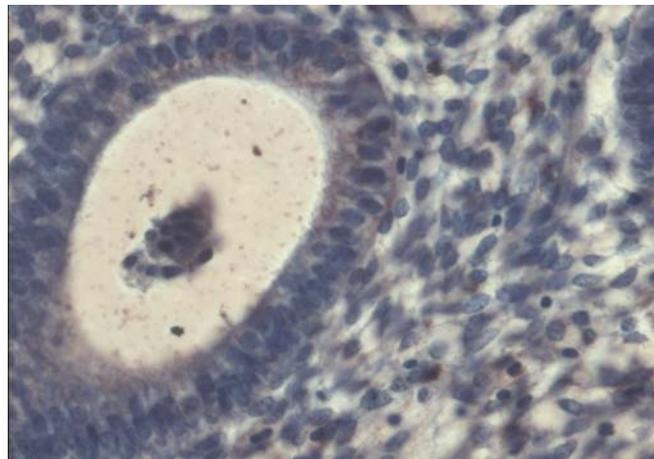
En la *figura 4. 14* puede apreciarse mediante inmunohistoquímica la localización de PAI-1 en cortes de endometrio de mujeres con endometriosis. Se observa una señal de PAI-1 a nivel del epitelio glandular y del estroma al utilizarse mayores aumentos.



**A**

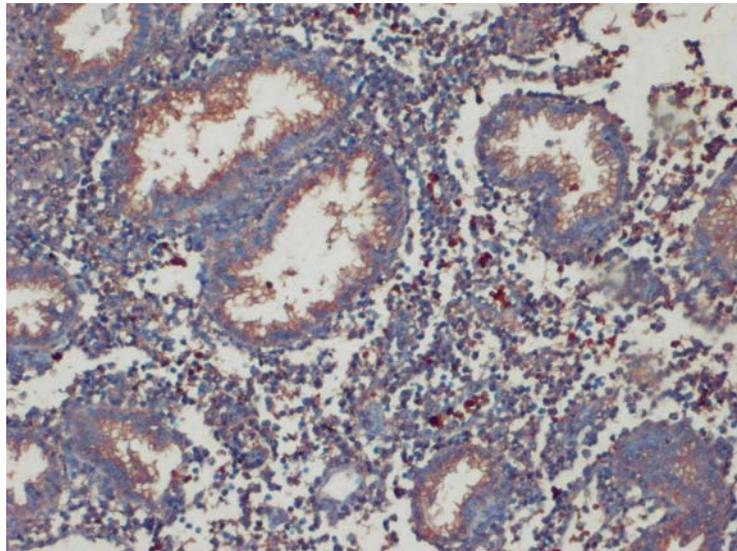


**B**

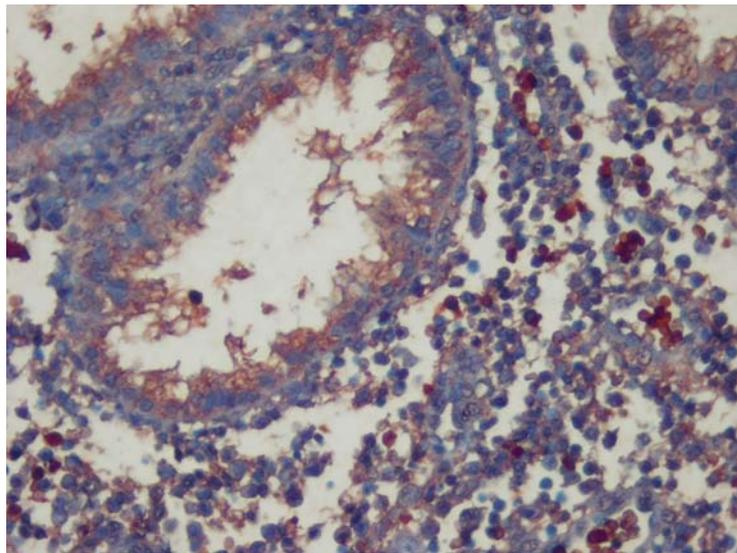


**C**

**Figura 4. 9. Localización de uPA en el endometrio control.** Se observa una débil señal tanto en el componente glandular como estromal del tejido endometrial. Panel A: Control negativo; Panel B y C: Anti-uPA sobre endometrio eutópico (100x y 400x respectivamente).

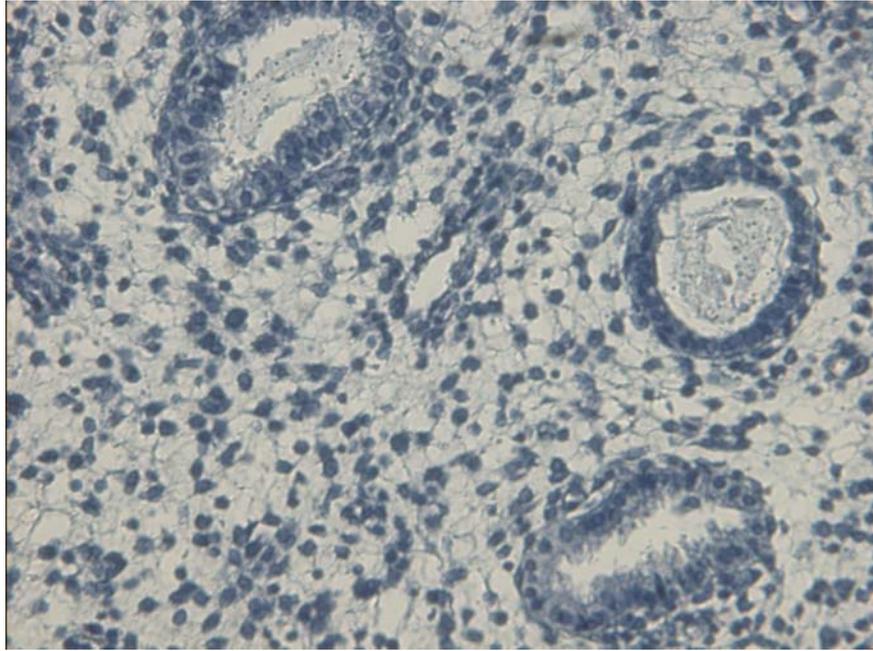


**A**

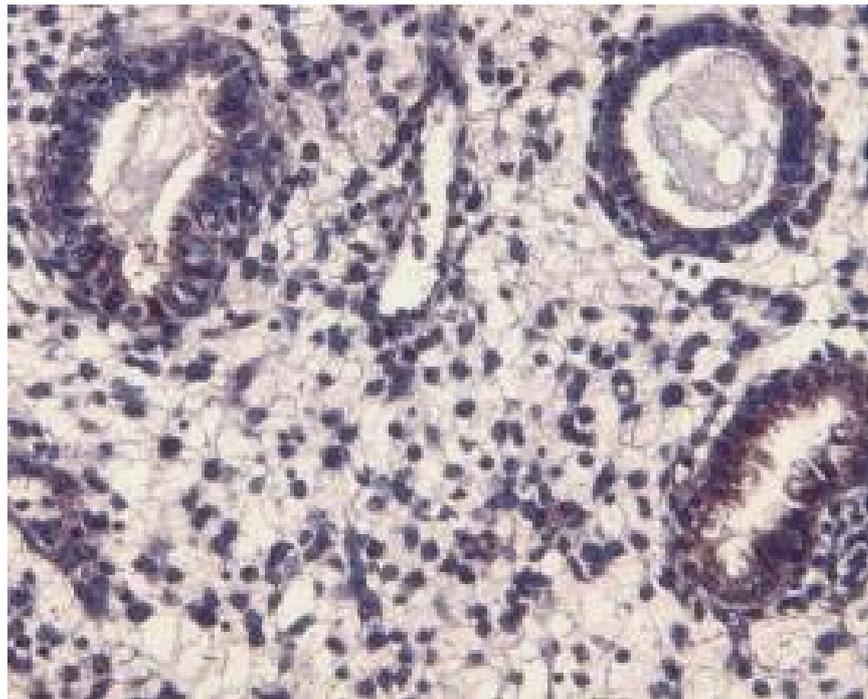


**B**

*Figura 4. 10. Localización de uPA en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis. El tejido endometrial presenta una señal positiva intensa, fundamentalmente en el epitelio de las glándulas endometriales. Panel A (200x) y B (400x).*

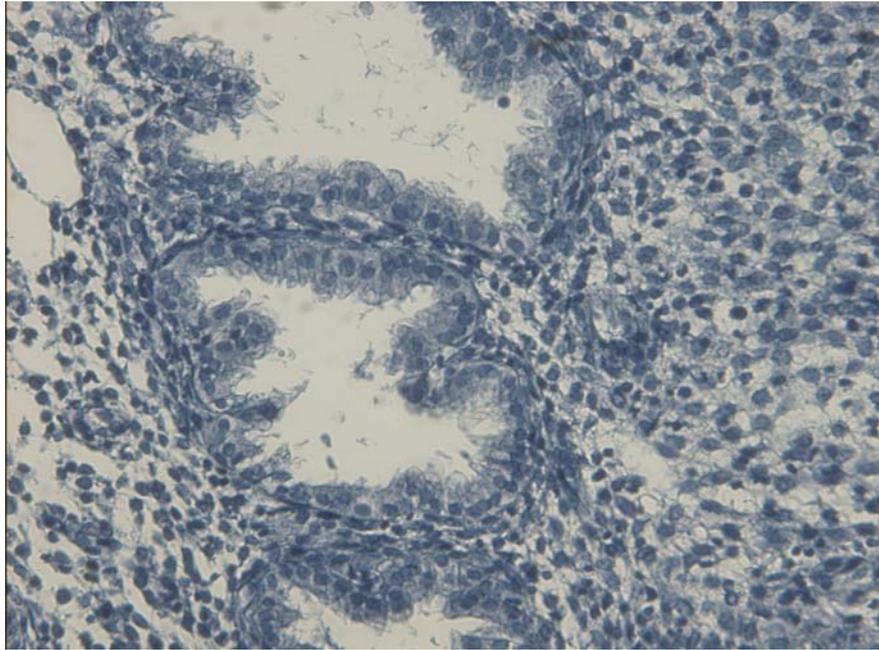


**A**

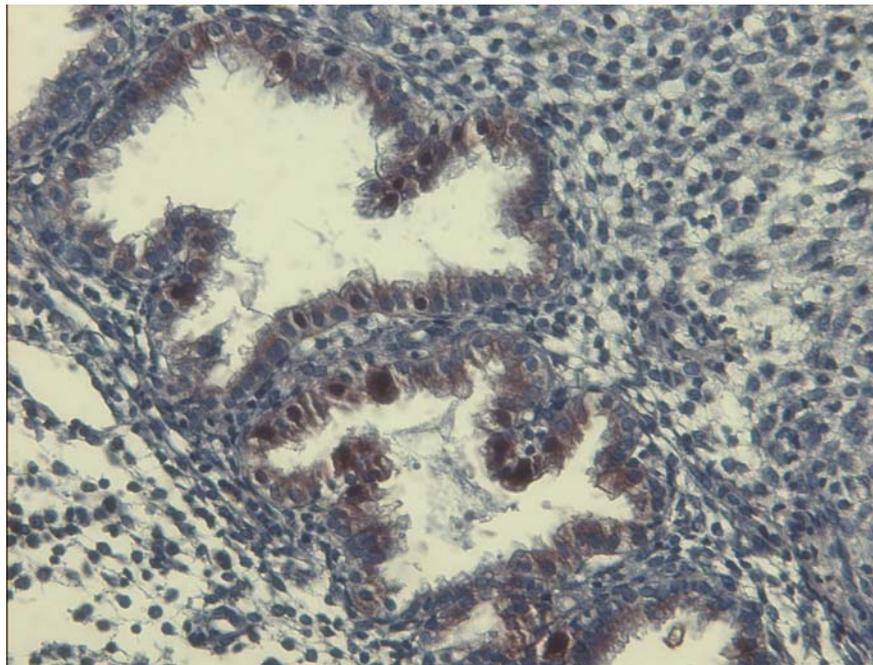


**B**

*Figura 4. 11. Localización de uPA en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis en fase proliferativa. Se evidencian estructuras glandulares proliferativas en el control negativo (Panel A) y se identifica una señal de uPA de moderada intensidad a nivel del epitelio glandular con una señal focal a nivel del estroma endometrial (panel B).*



**A**

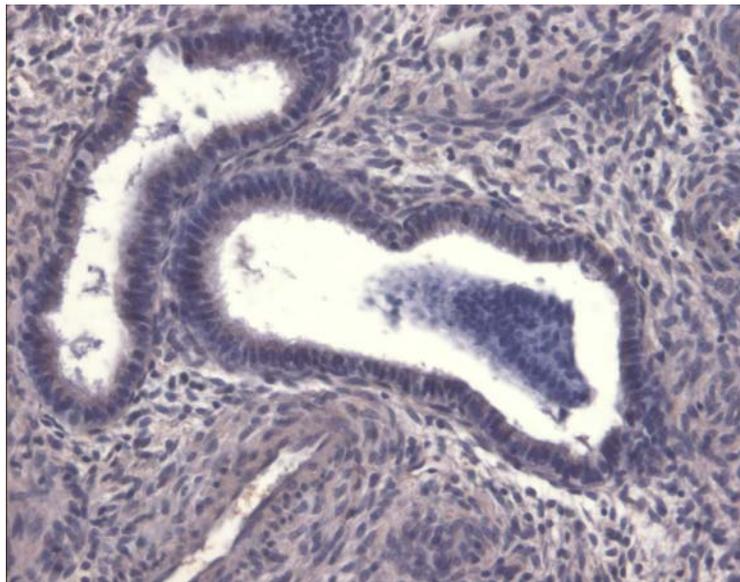


**B**

*Figura 4. 12. Localización de uPA en el endometrio eutópico en fase secretora de mujeres con endometriosis. Se observan estructuras glandulares en fase secretora en el control negativo (Panel A) y se identifica una señal de uPA intensa a nivel del epitelio glandular del endometrio eutópico de mujeres con endometriosis (Panel B).*

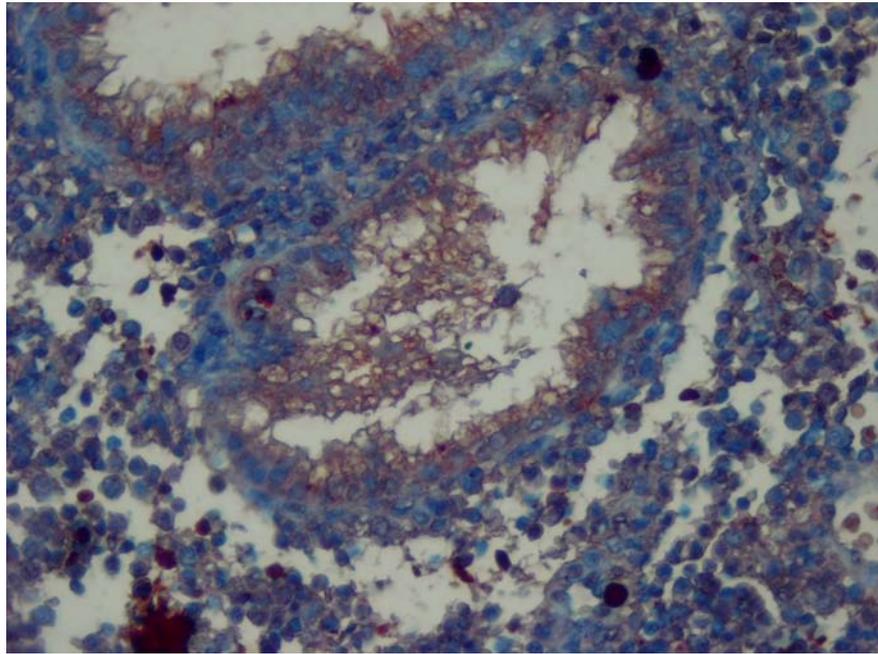


**A**

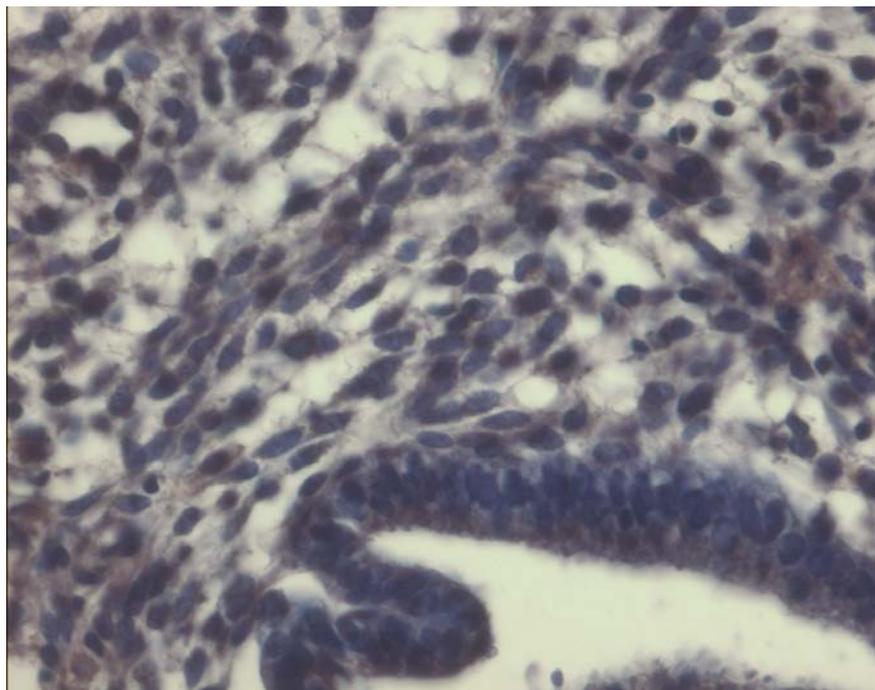


**B**

*Figura 4. 13. Localización de PAI-1 en el endometrio control. Se observa una señal débil difusa de PAI-1 en el componente estromal y glandular del tejido endometrial de las mujeres sin endometriosis. Panel A: Control negativo. Panel B: Anti-PAI-1 sobre tejido endometrial control (Aumento 200x).*



**A**



**B**

*Figura 4. 14. Localización de PAI-1 en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis. Se identifica la señal de PAI-1 en el epitelio glandular y el estroma, 200x (Panel A) y 400x (Panel B).*

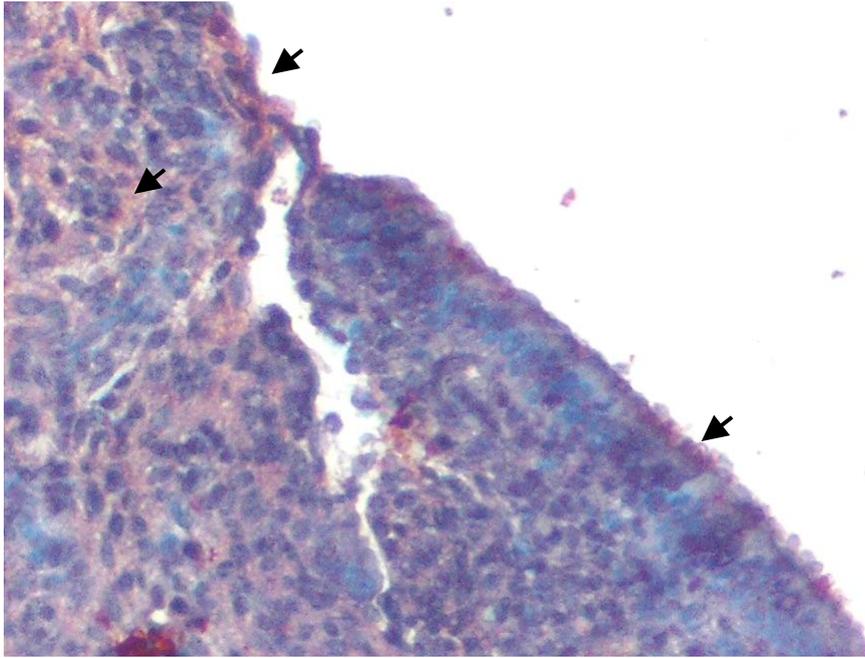
#### 4. 6. 2. TEJIDO ENDOMETRIÓSICO

Los resultados obtenidos al emplear las técnicas de inmunohistoquímica en extractos de tejido endometriósico se muestran en las *figuras 4. 15, 4. 16 y 4. 17*. Estas preparaciones permiten confirmar la presencia de tejido glandular y estroma endometrial en localizaciones ectópicas.

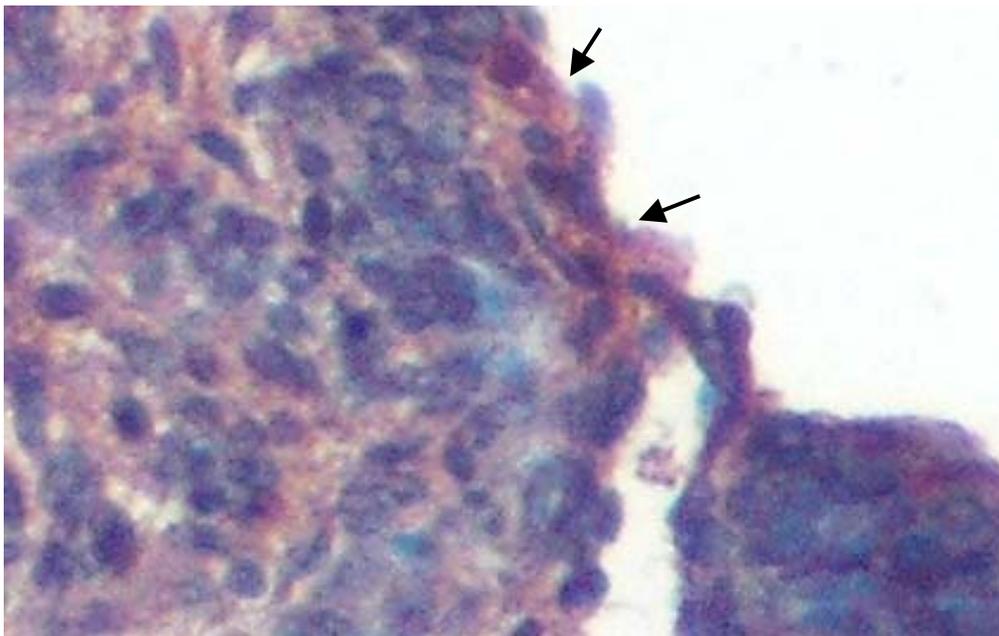
La *figura 4. 15* muestra los resultados obtenidos al emplear un anticuerpo anti-PAI-1 en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis. La expresión de PAI-1 es predominante en el componente estromal del tejido endometriósico y también en el epitelio glandular.

En la *figura 4. 16* se comparan preparaciones con anticuerpo anti-PAI-1 en el control negativo (*Panel A*) y en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis (*Panel B*). Una vez más, el control negativo (*Panel A*) permite identificar la arquitectura tisular y excluir señales inespecíficas.

En la *figura 4. 17* se comprueba la existencia de una débil señal cuando se emplean anticuerpos anti-uPA (*Panel A*). Sin embargo, si se emplean anticuerpos anti-PAI-3 (*Panel B*) se puede observar con claridad una señal difusa en el componente estromal del tejido endometriósico.

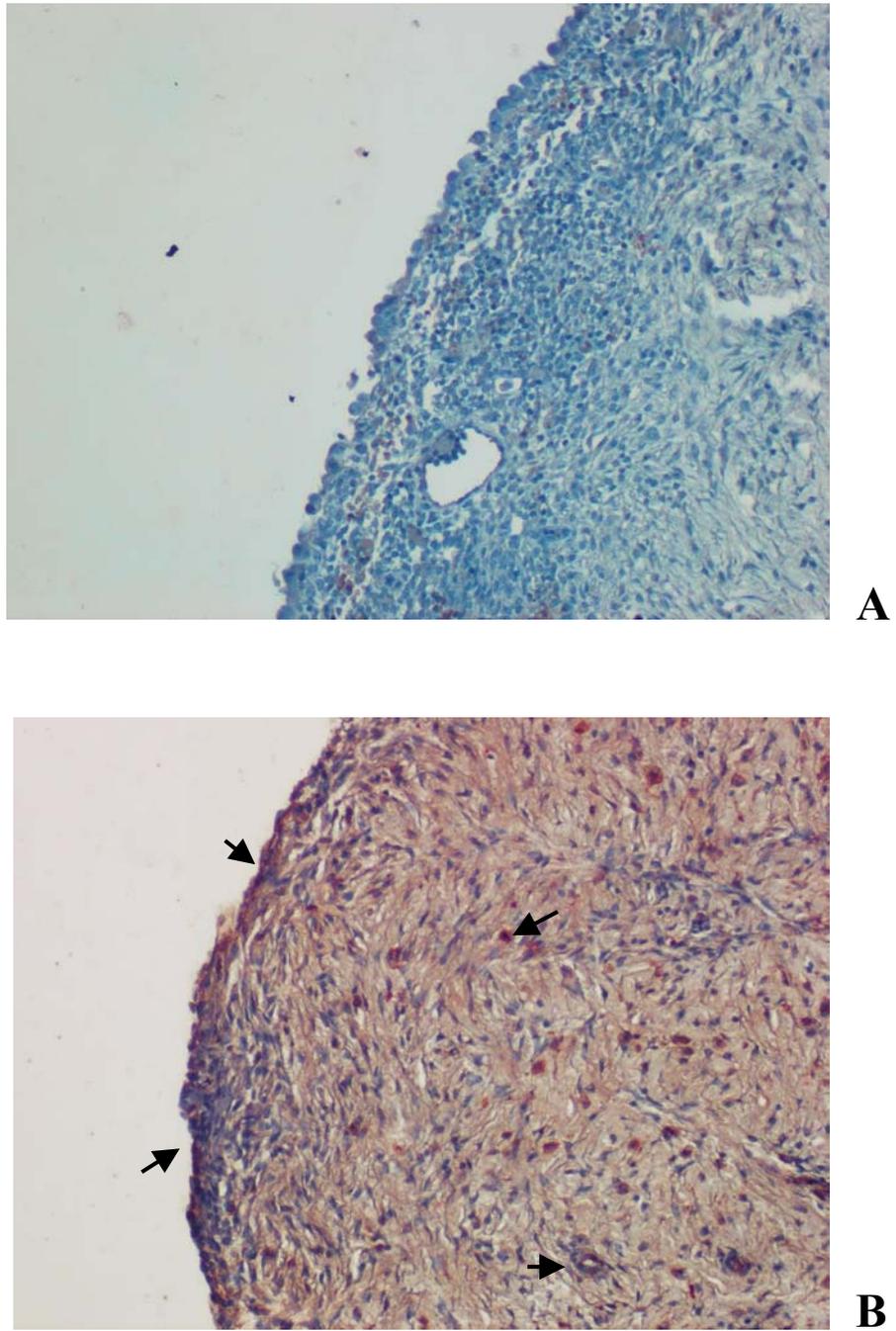


**A**

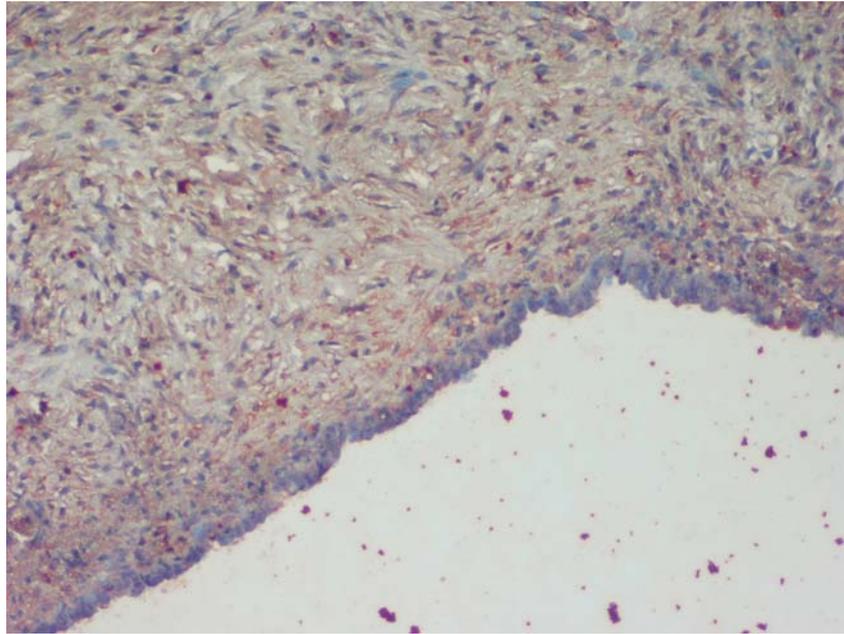


**B**

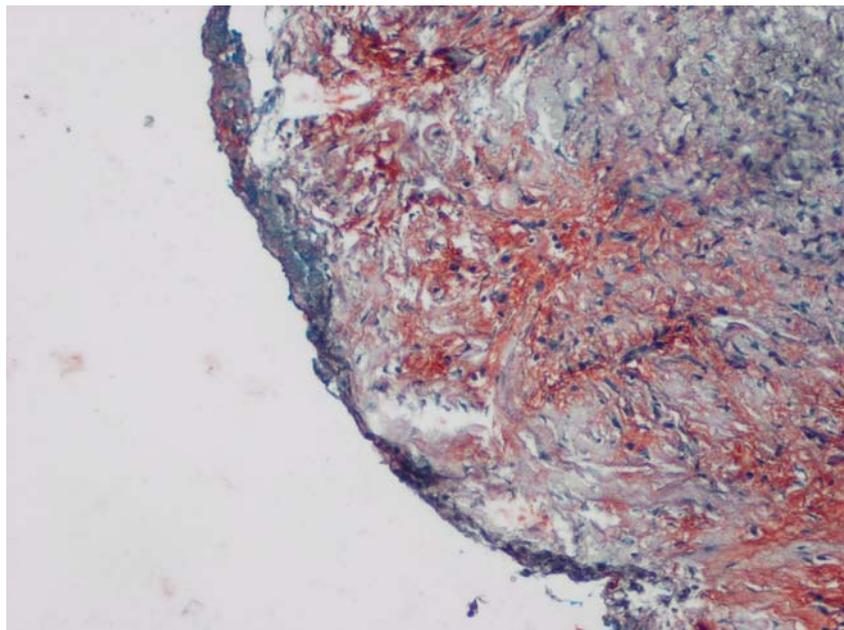
*Figura 4. 15. Localización mediante inmunohistoquímica de PAI-1 en el endometrio ectópico. Las flechas indican la posición de la señal positiva. Panel A: Aumento a 200x. Panel B: Aumento a 400x.*



**Figura 4. 16. Localización de PAI-1 en el endometrio ectópico. Las flechas indican la posición de la señal positiva. Panel A: Control negativo con IgG no inmune. Panel B: PAI-1 en tejido endometriósico (Aumento 100x).**



**A**



**B**

**Figura 4. 17. Localización de uPA y PAI-3 en el endometrio ectópico.** Se comprueba una débil señal de uPA (Panel A) que contrasta con la señal intensa de PAI-3 en el componente estromal (Panel B). Panel A: Anti-uPA; Panel B: Anti-PAI-3 (Aumento 100x).

#### 4. 7. HIBRIDACIÓN IN SITU

Las técnicas de hibridación *in situ* tratan de poner de manifiesto la presencia de un mRNA específico a nivel celular. Recientemente estas técnicas han alcanzado una sensibilidad suficiente como para poder detectar un escaso número de moléculas mRNAs presentes en el citoplasma celular. Este gran avance permite identificar células individuales que expresan genes específicos dentro de un tejido.

Con el objeto de identificar las células responsables de la síntesis de las diferentes proteínas analizadas previamente mediante técnicas inmunológicas, se desarrollaron una serie de experiencias de hibridación *in situ*. En las siguientes figuras se presentan los resultados obtenidos al emplearlas sobre cortes de tejido endometrial embebido en parafina de mujeres con endometriosis y controles. Tras la desintegración de los átomos de  $^{35}\text{S}$  incorporados en la sonda empleada, el revelado de la emulsión fotográfica pone de manifiesto la presencia de precipitados puntuales de plata allí donde previamente se ha hibridado la sonda. Estos granos de plata adquieren un color verde brillante al ser observados en un microscopio de fluorescencia dotado de un filtro del tipo *immunogold*. El tejido presenta una coloración azul en los núcleos y rosada en los citoplasmas como consecuencia de la tinción de hematoxilina-eosina aplicada. Finalmente, la detección de los granos de plata exige que la luz transmitida a través de la preparación no sea muy intensa, ya que en caso opuesto alteraría los colores del tejido.

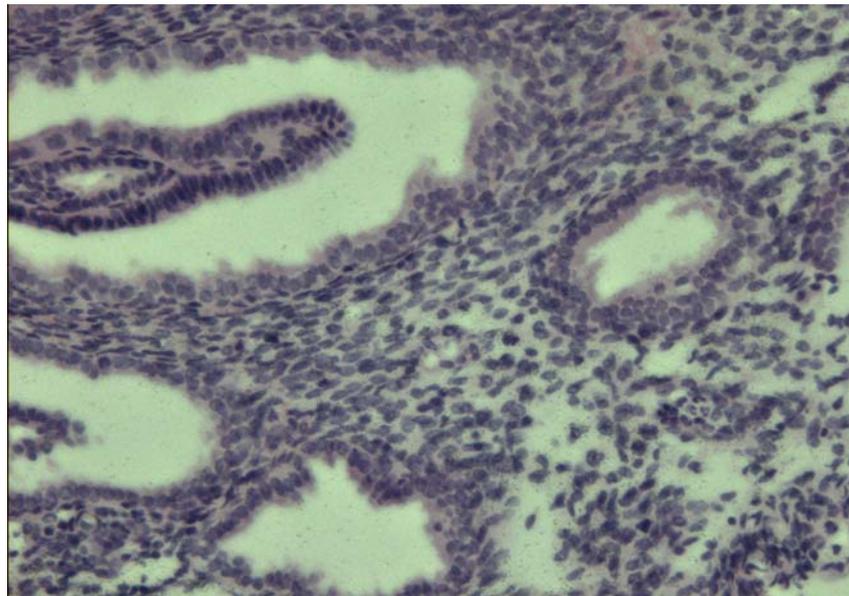
#### **4. 7. 1. ENDOMETRIO DE MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS**

La expresión del mRNA del PAI-1 en el endometrio control y en endometrio eutópico de mujeres sin y con endometriosis queda reflejado en las *figuras 4. 18 y 4. 19*. El tejido endometrial de estas mujeres muestra una débil señal positiva en el estroma. Esta señal es de carácter difuso y posee una intensidad similar en todo el tejido analizado.

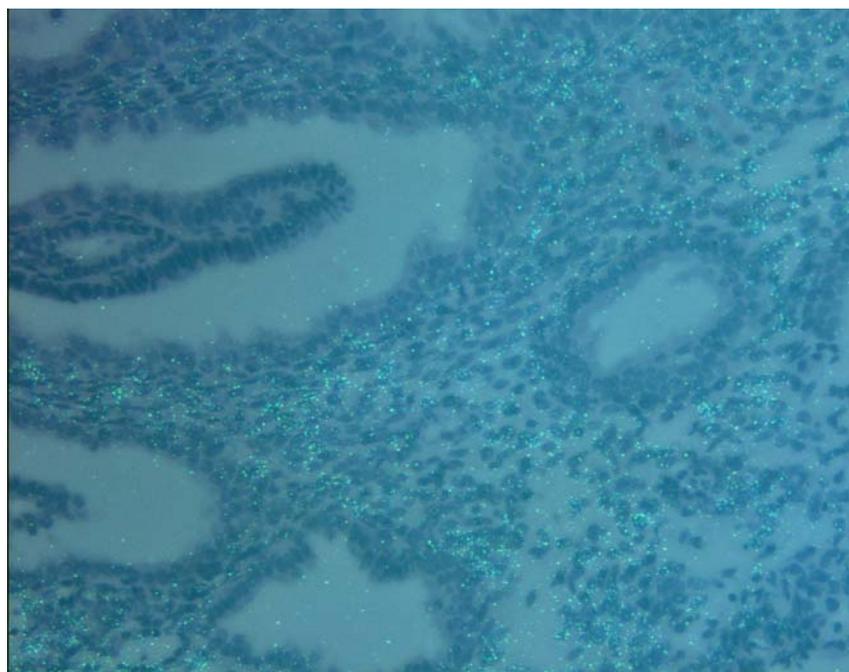
#### **4. 7. 2. TEJIDO ENDOMETRIÓSICO**

En las *figuras 4. 20, 4. 21 y 4. 22* se pueden observar los resultados obtenidos al estudiar la expresión del mRNA del PAI-1 en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis.

El *panel A* de la *figura 4. 20* muestra la ausencia de señal en el control negativo. Se visualiza mRNA de PAI-1 tanto en el epitelio glandular (*Panel B*) como en el estroma del tejido endometriósico de mujeres con endometriosis (*Panel C*). La *figura 4. 21* muestra la localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en el endotelio vascular del endometrioma ovárico (*Paneles B y C*). En la *figura 4. 22* la expresión del mRNA de PAI-1 se localiza en el estroma del endometrioma (*Panel B*).

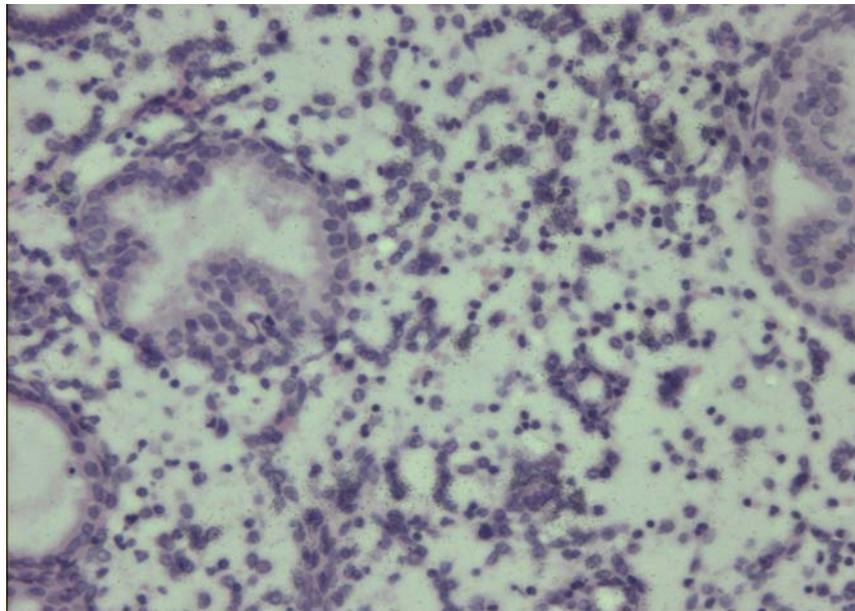


**A**

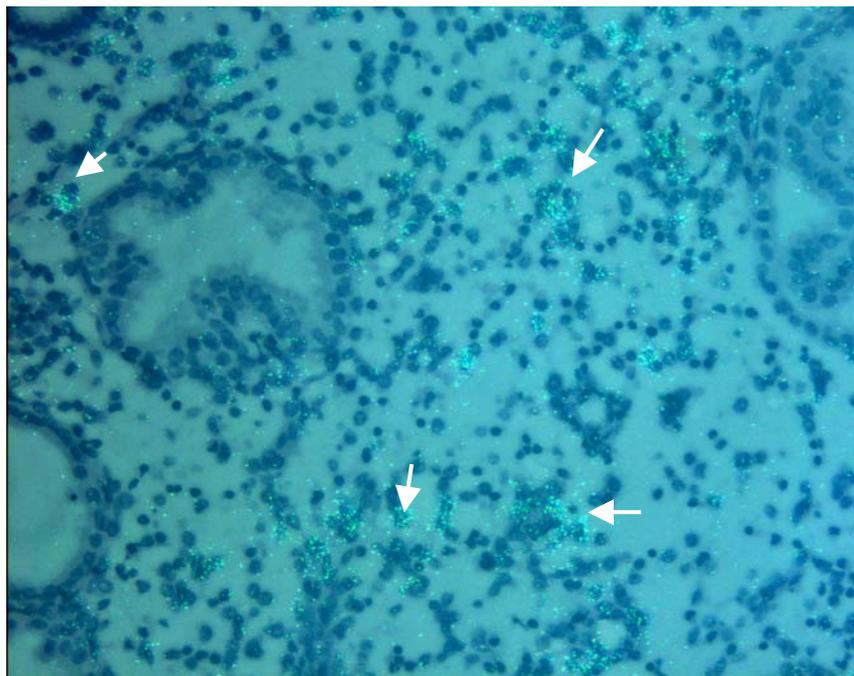


**B**

*Figura 4. 18. Localización del mRNA del PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrio control. Se observa una débil señal inespecífica de mRNA en el estroma del tejido endometrial procedente de mujeres sin endometriosis. Panel A: Control negativo; Panel B: Visualización de expresión de mRNA (Aumento 200x).*

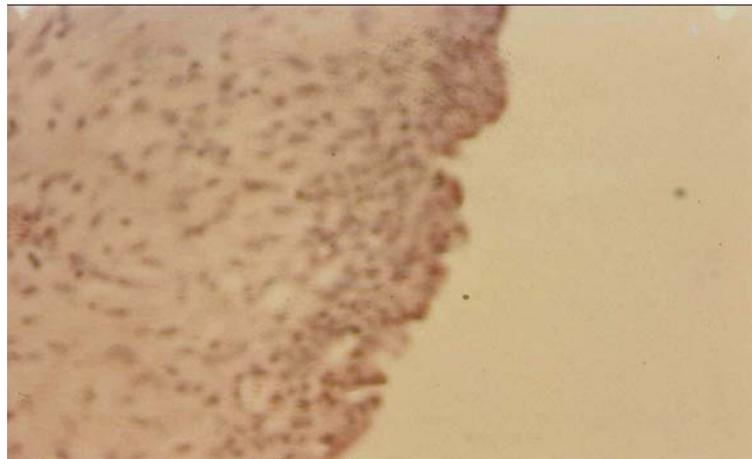


**A**

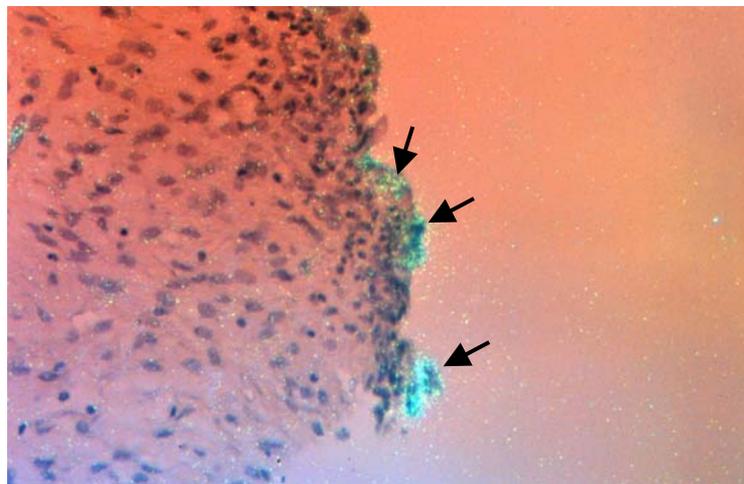


**B**

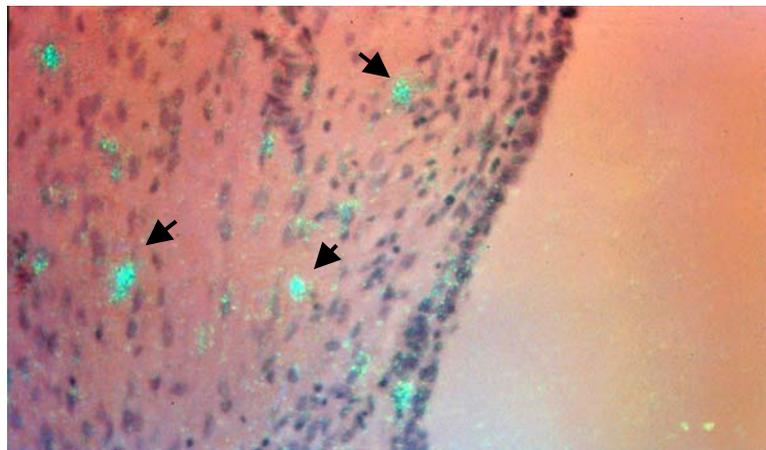
*Figura 4. 19. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrio eutópico. Existe una débil señal positiva en el estroma endometrial. Las flechas indican los lugares de la señal positiva. Panel A: Control negativo; Panel B: Visualización de la expresión de mRNA (Aumento 200x).*



**A**

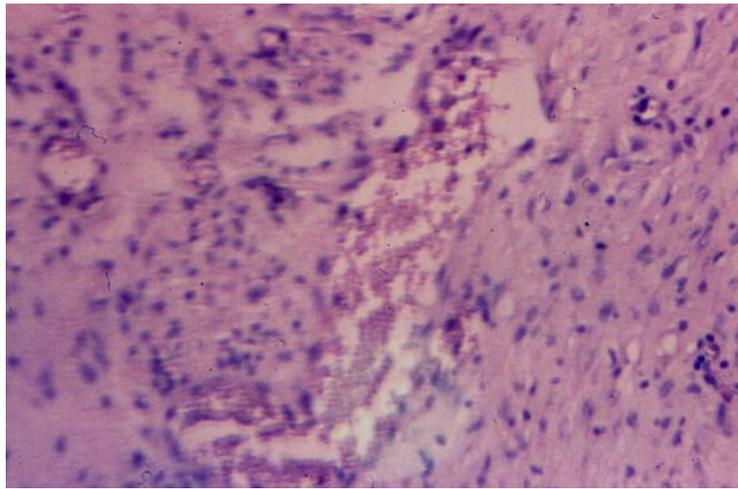


**B**

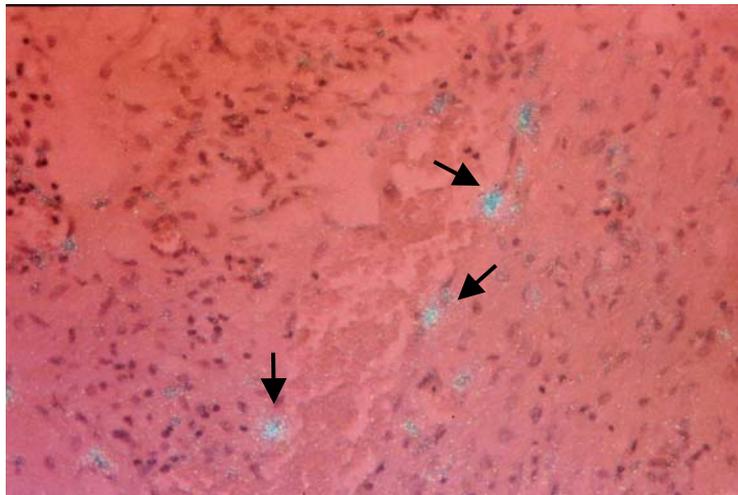


**C**

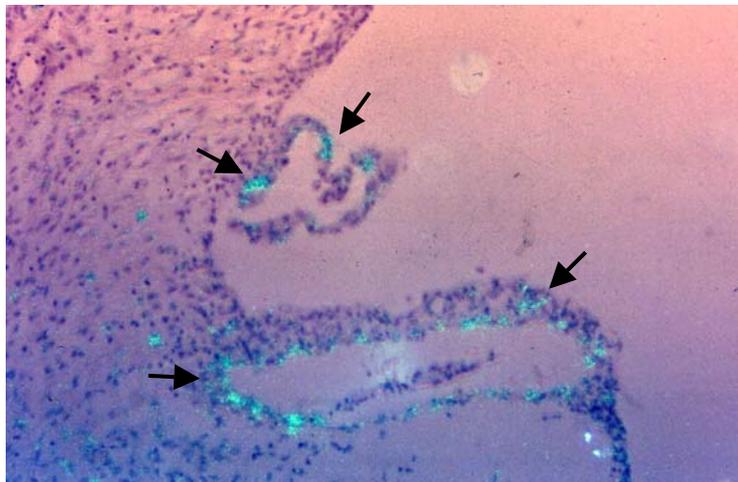
*Figura 4. 20. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrioma. Las flechas indican los lugares en los que existe una señal positiva. Panel A: Control negativo; Panel B: señal del mRNA de PAI-1 en el epitelio glandular; Panel C: Visualización de expresión del mRNA de PAI-1 sobre el estroma (Aumento 200x).*



**A**

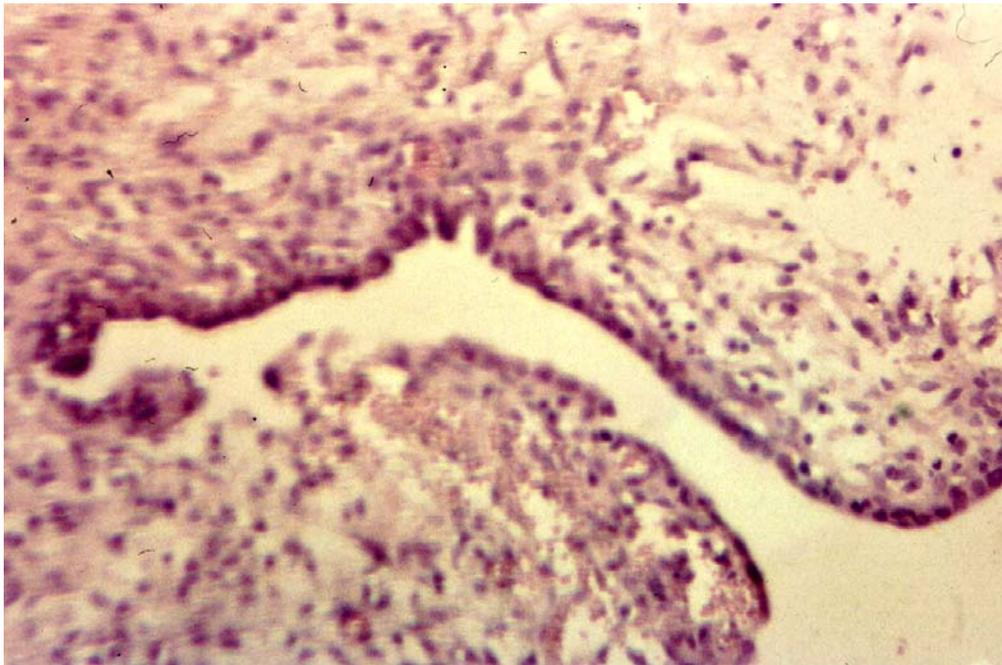


**B**

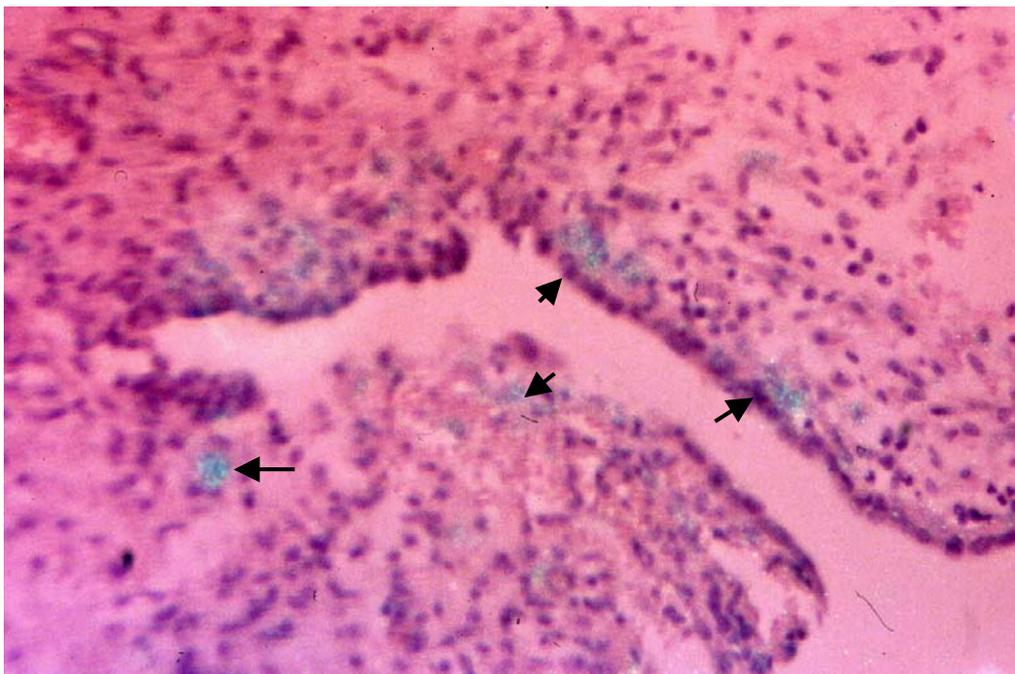


**C**

**Figura 4. 21. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrioma. Las flechas indican los lugares en los que existe una señal positiva Panel A: Control negativo (Aumento 200x); Panel B: señal del mRNA de PAI-1 en el endotelio vascular (Aumento 200x); Panel C: Visualización de expresión del mRNA de PAI-1 sobre el endotelio vascular y el epitelio glandular (Aumento 100x).**



**A**



**B**

*Figura 4. 22. Localización del mRNA de PAI-1 mediante hibridación in situ en cortes de endometrioma. Panel A: Control negativo; Panel B: Visualización de expresión del mRNA de PAI-1 sobre el estroma y epitelio glandular.*

## **5.- DISCUSIÓN**

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna pero de importante repercusión clínica y cuya etiología permanece todavía desconocida a pesar de varias décadas de estudio en este campo. La teoría de la implantación, basada en un proceso de menstruación retrógrada, supone la existencia de un tejido endometrial con capacidad de adhesión e invasión del tejido peritoneal y ovárico debido a su capacidad proteolítica sobre la matriz extracelular (Spuijbroek y col, 1992; Kobayashi y col, 2000). En el desarrollo de este proceso están implicados el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas.

El sistema fibrinolítico está relacionado con diversos procesos tales como la lisis del coágulo de fibrina, la remodelación tisular y la invasión tumoral. En relación al sistema reproductivo se ha destacado su papel en los procesos de ovulación, fecundación e implantación del embrión, así como en otras situaciones patológicas como es la endometriosis (Loskutoff DJ y col, 1991; Estellés A y col, 1994; Gilabert J y col, 1995b; Andreasen PA y col, 1997; Murphy G y col, 2000; Castelló R y col, 2002).

Tal y como se ha expuesto anteriormente, en el presente trabajo se han analizado los niveles antigénicos y funcionales de diversos componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas. Se ha observado un aumento de los niveles de uPA y MMP-3 en el endometrio de las mujeres con endometriosis, al compararlas con los controles libres de enfermedad. Por otra parte, existe un mayor nivel de PAI-1 y TIMP-1 en el tejido endometriósico de endometriomas ováricos que en el endometrio de las mujeres con o sin endometriosis. Se ha sugerido que fragmentos de tejido endometrial ectópico poseen la capacidad de adherirse e invadir una superficie peritoneal intacta (Witz CA y col, 2001). Los componentes de estos fragmentos presentes en el tejido endometrial y endometriósico, entre los que se encuentran los activadores del plasminógeno y las MMPs, participarían activamente en el establecimiento y remodelado de las lesiones endometriósicas. La alteración de la expresión de los activadores del plasminógeno, de las MMPs y de sus inhibidores

podría asociarse con un fenotipo celular más agresivo con una mayor capacidad para degradar la matriz extracelular peritoneal.

En relación al sistema fibrinolítico, hemos observado un aumento en el nivel antigénico de la uPA en el endometrio de mujeres con endometriosis en comparación con el endometrio de los controles. Estudios previos han sugerido igualmente que la mayor concentración de uPA en el endometrio de las mujeres con endometriosis podría alterar la degradación del endometrio durante la menstruación (Bruse C y col, 1998; Kobayashi H y col, 2000). De esta manera, fragmentos con mayor potencial para degradar la matriz extracelular podrían migrar a la cavidad peritoneal mediante el fenómeno de menstruación retrógrada y posteriormente implantarse en localizaciones ectópicas.

Estudios previos han encontrado una concentración mayor de uPA antigénica en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis (Bruse C y col, 1998). Sin embargo, nuestro estudio no ha evidenciado este aumento de uPA en el endometrio ectópico. Las diferentes características de las muestras endometriósicas podrían explicar la discrepancia en los resultados observados. En el presente estudio la mayor parte de las muestras provenían de endometriomas ováricos y las lesiones endometriósicas peritoneales fueron estudiadas por separado. Por el contrario, estudios previos consideraron conjuntamente los quistes endometriósicos, los implantes en la cicatriz de la pared abdominal, o las lesiones peritoneales y vaginales (Bruse C y col, 1998).

En el presente estudio se analiza el comportamiento proteolítico del endometrio y de los implantes endometriósicos peritoneales de mujeres con estadios iniciales de la enfermedad. La obtención quirúrgica del implante peritoneal es un proceso dificultoso y supone, en algunas localizaciones, un riesgo de lesión visceral o vascular. Por ello, la mayoría de las ocasiones se opta por la fulguración de dichos implantes sin obtener muestra para estudio histológico, lo que supone una importante limitación en el estudio de estas pacientes. Nosotros hemos analizado cinco implantes endometriósicos peritoneales tras realizar una cuidadosa disección

endoscópica de los mismos y hemos observado la existencia de un mayor nivel de uPA en comparación con el tejido proveniente de los endometriomas ováricos. Además, el endometrio de las pacientes con estadios iniciales de la enfermedad poseía un nivel más elevado de uPA que el endometrio de mujeres con estadios avanzados de la enfermedad (*Tabla 4. 9.*). Este hecho podría explicar la mayor capacidad de implantación a nivel peritoneal de los fragmentos endometriales en los estadios iniciales de la enfermedad, lo que es congruente con el hallazgo frecuente de lesiones peritoneales activas en estas pacientes. Sin embargo, la escasa cantidad de muestra obtenida de los implantes peritoneales supone el principal factor limitante para conseguir un número suficiente de muestras que permita detectar diferencias significativas. Nuestros resultados sugieren que la expresión de uPA está significativamente aumentada en estadios iniciales, mientras que tras el desarrollo del quiste endometriósico, esta actividad ya no está aumentada. Una hipótesis similar se ha postulado con anterioridad en relación a la expresión de la MMP-2 en la endometriosis (Chung HW y col, 2002).

Se ha comprobado la existencia de unos niveles mayores de PAI-1 en el tejido endometriósico en comparación con el endometrio ectópico. Estos cambios podrían estar implicados en la capacidad de crecimiento e invasión de la lesión endometriósica. Las concentraciones mayores de PAI-1 en el tejido endometriósico en comparación con el endometrio, también han sido evidenciadas en estudios previos (Bruse C y col, 1998). En el presente trabajo, el endometrio de las mujeres con endometriosis no mostró aumento en los niveles antigénicos de PAI-1 en comparación con los controles. Estos resultados son concordantes con estudios previos (Fernandez-Shaw S y col, 1995), donde no se encontraron diferencias en la expresión de PAI-1 mediante técnicas de inmunohistoquímica entre el endometrio de mujeres con y sin endometriosis. El hallazgo de un nivel elevado de PAI-1 en los endometriomas ováricos de nuestro estudio sugiere que su expresión está correlacionada con estadios más avanzados de la enfermedad.

El PAI-3 es un inhibidor de proteasas presente en el plasma, la orina, y el líquido seminal y folicular. Trabajos previos han sugerido que este inhibidor podría estar implicado en la reproducción humana (España y col, 1991; 1993; 1999). En el

presente estudio, se han encontrado unos niveles más bajos de PAI-3 en el tejido endometriósico en comparación con el endometrio, sin embargo no se han detectado diferencias estadísticamente significativas en los complejos de PAI-3 entre los grupos estudiados. Hasta la fecha, no hemos encontrado en la literatura otros estudios sobre los cambios en los niveles de este inhibidor en relación con el tejido endometrial ni con la endometriosis. Se ha sugerido que el PAI-3 protege a la uPA de la inactivación por el PAI-1 (Schwartz BS y España F, 1999). La disminución en los niveles de PAI-3 observada en el tejido endometriósico podría potenciar la inhibición de la uPA por PAI-1, que además está incrementado en este tejido y contribuye al proceso de implantación de las células endometriales.

En relación al sistema de las MMPs, hemos evidenciado la presencia de niveles elevados de MMP-3 en el endometrio de mujeres con endometriosis, que podrían potenciar su capacidad invasiva. La migración retrógrada de fragmentos endometriales hacia la cavidad peritoneal podría iniciar el proceso de degradación de la matriz extracelular y facilitar la invasión tisular. Estos hallazgos han sido confirmados en estudios previos (Sillem M y col, 2001). En este sentido, se han desarrollado modelos de endometriosis inducida quirúrgicamente en rodeores para estudiar el papel de las MMPs en la patogenia de esta enfermedad. En contraste con nuestros resultados, en estos modelos se detectó la expresión de mRNA para MMP-3 en implantes endometriósicos pero no en tejido uterino eutópico (Cox KE y col, 2001). Sin embargo, la inducción de endometriosis mediante autotransplante del endometrio del animal no es un proceso espontáneo como en el ser humano. Las diferencias observadas en los niveles de MMP-3 en el endometrio eutópico, entre nuestro estudio y los estudios animales, podrían explicar el papel de esta MMP en la patogenia de la enfermedad.

También hemos constatado un aumento de los niveles de TIMP-1 en el tejido endometriósico. Este aumento se ha demostrado previamente en estudios *in vitro* (Sharpe-Timms KL y col, 1995 y 2001). Sin embargo, otros autores han encontrado una menor expresión de TIMP-1 en tejido endometriósico en comparación con el endometrio (Gottschalk C y col, 2000). Otros estudios han detectado un aumento de la secreción de TIMP-1 por parte de las células endometriales de las pacientes con

endometriosis (Sillem M y col, 2001). El aumento de TIMP-1 y la inhibición de la actividad de MMP que conlleva, explicaría el hallazgo clínico frecuente de un quiste endometriósico aislado sin invasión del tejido ovárico circundante.

La actividad proteolítica de cada tejido está sometida a una compleja regulación por factores hormonales y citoquinas que son variables en cada paciente y potencialmente podrían interferir en los resultados observados. Para evitar este sesgo de confusión, se analizaron muestras apareadas de endometrio y tejido endometriósico procedentes de la misma paciente y obtenidas durante el mismo procedimiento quirúrgico. En este subgrupo se confirmó el aumento de activadores en el endometrio eutópico y un aumento de los inhibidores en el tejido endometriósico.

La separación del tejido endometriósico del tejido ovárico sano se realiza de forma macroscópica mediante la exéresis del quiste endometriósico. Sin embargo, el plano de disección no es siempre identificable con facilidad lo que supone una limitación en la correcta recogida de las muestras. Se estudiaron cinco biopsias de ovario para comprobar si el parénquima ovárico produce niveles de alguno de los parámetros estudiados que pudieran interferir en los resultados obtenidos. Se detectaron niveles de los parámetros estudiados mucho menores en el tejido endometriósico, por lo que la contaminación accidental de las muestras por tejido ovárico no interferiría con los resultados observados.

La endometriosis es una enfermedad crónica y progresiva, con un comportamiento clínico diferente en cada paciente. En el presente estudio se ha evaluado la existencia de recidiva de la enfermedad tras la cirugía para identificar posibles factores proteolíticos tisulares predictores de un comportamiento clínico más agresivo. El análisis de los diversos componentes del sistema fibrinolítico y de las MMPs en función de la recidiva de la enfermedad no encontró ningún cambio significativo. Posiblemente existan otros factores implicados en la recidiva, como pueda ser la técnica quirúrgica empleada o la vía de acceso.

Cuando analizamos el líquido peritoneal, encontramos un aumento en los niveles de uPA en las pacientes con endometriosis (estadios III y IV) en relación a las mujeres sin la enfermedad. Por el contrario, no se observan diferencias en el resto de los parámetros fibrinolíticos estudiados. En la literatura existen resultados contradictorios en relación a la actividad fibrinolítica en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis. Algunos autores han encontrado un aumento en la concentración de tPA y uPA en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (Astedt B y Nordenskjold F, 1984). Por el contrario, otros estudios no han observado diferencias en la actividad fibrinolítica del líquido peritoneal, sugiriendo que las alteraciones proteolíticas podrían estar presentes en el endometrio ectópico y no ser detectables en el líquido peritoneal (Batzofin JH y col, 1985; Duselman GA y col, 1988). Además, se ha evidenciado un aumento de los niveles de uPA en el líquido peritoneal en los casos de adherencias pélvicas y una disminución de los niveles de PAI-2 en estadios iniciales de endometriosis sin síndrome adherencial asociado (Edelstam G y col, 1998). En consecuencia, el aumento del nivel de uPA en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis traduciría una activación del sistema proteolítico en un intento de limitar el proceso de neoformación de adherencias.

En el presente trabajo se han empleado técnicas de inmunohistoquímica en aquellos componentes del sistema fibrinolítico en los que se observaron variaciones entre los diferentes extractos tisulares (uPA, PAI-1 y PAI-3). Se ha pretendido localizar el lugar de expresión de cada proteína en el tejido, así como analizar la existencia de posibles variaciones de la misma. Con relación a la uPA se ha observado un aumento de su expresión en el epitelio glandular del endometrio de las mujeres con endometriosis que confirma los resultados obtenidos con técnicas de ELISA. En contraposición con estos hallazgos, Fernandez-Shaw y col (1995), no demostraron variaciones de la expresión de uPA en el endometrio de las mujeres con endometriosis por inmunohistoquímica.

En cuanto a la expresión inmunohistoquímica de los inhibidores fibrinolíticos, el PAI-1 presenta una señal más intensa en el tejido endometriósico, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos por técnicas de ELISA. Esta señal se localiza en el estroma, en el epitelio glandular y en el endotelio de los vasos del tejido endometriósico. El estudio por hibridación *in situ* evidencia una expresión del mRNA del PAI-1 en aquellos lugares en donde se expresó la proteína. Por otra parte, el PAI-3 se expresa de una manera difusa en el estroma del tejido endometriósico. Aunque se ha sugerido un papel potencial de este inhibidor en la génesis del cáncer de algunos tejidos regulados hormonalmente (Palmieri D y col, 2002), no hay trabajos previos en relación al PAI-3 y la endometriosis, por lo que se requerirán otros estudios para delimitar el papel del mismo en esta enfermedad.

Este trabajo analiza los niveles antigénicos y funcionales de diferentes componentes del sistema de activación del plasminógeno y de las MMPs en endometriosis. Sin embargo, la cantidad de tejido disponible es limitada y los métodos convencionales requieren cantidades relativamente grandes de material. Por otra parte, la proteína representa sólo un aspecto de la alteración en la expresión de los genes celulares. Por ello, estamos llevando a cabo la cuantificación de los niveles de mRNA utilizando un método de RT-PCR cuantitativo en tiempo real que previamente se ha puesto a punto y se ha validado en nuestro laboratorio (Castelló R y col, 2002). Los resultados preliminares muestran una correlación entre los niveles de mRNA de los componentes estudiados y los niveles antigénicos.

La esterilidad asociada con estadios avanzados de endometriosis podría ser explicada por la distorsión anatómica causada por la enfermedad en el tracto reproductivo femenino. Sin embargo, la esterilidad asociada a la endometriosis mínima o moderada y su impacto negativo en la implantación embrionaria tras técnicas de reproducción asistida, plantea la necesidad de identificar otros mecanismos fisiopatológicos (Simón y col, 1994; Arici y col, 1996). En esta línea, la existencia de un estado proteolítico aumentado en el endometrio de mujeres con endometriosis podría tener un papel etiopatogénico relevante en esta enfermedad y explicar su menor capacidad fértil. En la actualidad, nuestro grupo de trabajo, está

realizando un estudio para identificar el papel del sistema fibrinolítico y de las MMPs en el fallo implantatorio de las mujeres con endometriosis, con el objetivo de mejorar la aplicación de las diferentes técnicas de reproducción asistida en estas pacientes.

La existencia de un desbalance proteolítico a nivel endometrial, peritoneal y en el tejido endometriósico plantea nuevas líneas de investigación encaminadas a la aplicación de terapias que corrijan esta alteración. En este sentido, se ha demostrado que la administración intraperitoneal de TIMP-1 en modelos de experimentación animal, previene el desarrollo de la enfermedad (Bruner KL y col, 1997). Además, se ha detectado un nivel menor de TIMP-1 en el líquido peritoneal en los estadios iniciales de la enfermedad (Szamatowicz J y col, 2002) y un aumento del mismo tras la terapia con análogos de la GnRH (Sharpe-Timms KL y col, 1998b). En nuestro trabajo no se han evidenciado cambios en el nivel de TIMP-1 en el líquido peritoneal de las mujeres con estadios avanzados de la enfermedad. El ambiente peritoneal de estas mujeres es diferente al de los estadios iniciales, posiblemente debido a la presencia de endometriomas en el ovario o a la existencia de implantes peritoneales inactivos con una menor capacidad proteolítica. Nuestros resultados sugieren que las líneas de investigación encaminadas al estudio de un posible valor terapéutico de los TIMPs administrados intraperitonealmente, serían justificables desde el punto de vista del comportamiento proteolítico de la enfermedad.

Existen resultados controvertidos en relación a la contribución del sistema fibrinolítico en la formación de adherencias peritoneales y el desarrollo de implantes endometriósicos. La administración intraoperatoria de tPA ha demostrado ser capaz de prevenir la formación de adherencias, sin interferir con el proceso de cicatrización peritoneal (Evans DM y col, 1993; Tsuji K y col, 1996; Lai HS y col, 1998). Sin embargo, en el presente estudio hemos evidenciado un nivel mayor de uPA en el líquido peritoneal de mujeres con estadios avanzados de la enfermedad, donde se asocia con frecuencia a un síndrome adherencial. Queda por determinar si el aumento de la actividad fibrinolítica en el líquido peritoneal es la manifestación secundaria a la neoformación de adherencias peritoneales, o se produce para contribuir a limitar el desarrollo de las mismas una vez se ha lesionado el peritoneo.

Nuestros resultados nos permiten especular en la secuencia de acontecimientos que llevaría a la implantación y la formación del quiste endometriósico. El aumento inicial de la actividad enzimática (uPA y MMP-3) observada en el endometrio de mujeres con endometriosis podría aumentar la adhesión del tejido endometrial a la superficie ovárica y peritoneal, así como facilitar la invasión de la matriz extracelular. Este proceso podría desencadenar la formación de la lesión endometriósica inicial. Una vez formado el quiste endometriósico ovárico se produce un aumento de los niveles de inhibidores (PAI-1 y TIMP-1), sin detectarse un aumento en la actividad proteolítica. La razón por la cual esta actividad proteolítica se limita a los estadios iniciales de la enfermedad es todavía desconocida, pero este comportamiento podría explicar, tal y como se ha referido anteriormente, la formación del quiste endometriósico sin invasión del tejido ovárico circundante.

## **6.- CONCLUSIONES**

- 1.- El endometrio de las mujeres con endometriosis posee una mayor capacidad proteolítica mediada por un aumento de los niveles proteicos de uPA y MMP-3. Este hecho podría contribuir al mayor potencial invasivo de las células endometriales y a la formación de la lesión endometriósica inicial.
- 2.- La mayor expresión de inhibidores, PAI-1 y TIMP-1, en el quiste endometriósico sugiere que se trata de una lesión con una baja actividad proteolítica.
- 3.- La disminución del nivel antigénico de PAI-3 en el tejido endometriósico, en comparación con el endometrio de mujeres sin endometriosis, podría potenciar la inhibición de la uPA por el PAI-1 y contribuir a la disminución en su actividad proteolítica.
- 4.- La ausencia de datos significativos en el análisis de los diversos componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas en función de la recidiva de la enfermedad refuerza la posibilidad de que existan otros factores implicados en la recidiva.
- 5.- El aumento de uPA en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis en estadios avanzados, refleja una mayor actividad proteolítica que podría producirse para limitar el desarrollo de adherencias peritoneales una vez se ha lesionado el peritoneo.
- 6.- Por técnicas de inmunohistoquímica se ha confirmado que la mayor expresión de uPA, en el endometrio de las pacientes con endometriosis, está localizada en el epitelio glandular. La hibridación *in situ* permite detectar una expresión focal del mRNA de PAI-1 en el estroma, el epitelio glandular y el endotelio de los vasos del endometrioma ovárico.

- 7.- Los resultados del presente estudio sugieren que el aumento de activadores en el endometrio de mujeres con endometriosis podría contribuir al potencial invasivo de las células endometriales, fundamentalmente en los estadios precoces de la enfermedad. El aumento de inhibidores y la disminución de la actividad proteolítica observados en el tejido endometriósico podría explicar el frecuente hallazgo clínico del quiste endometriósico aislado sin invasión del tejido ovárico circundante.
- 8.- La existencia de un desbalance proteolítico a nivel endometrial, peritoneal y en el tejido endometriósico podría abrir nuevas líneas de investigación encaminadas a la aplicación de nuevas terapéuticas que corrijan esta alteración en los estadios iniciales de la enfermedad.

## **7.- BIBLIOGRAFÍA**

- Acosta AA, Buttram VC, Besch PK, Malinak LR, Franklin RR, Vanderheyden JD. A proposed classification of pelvic endometriosis. *Obstet Gynecol* 1973; 42: 19-25
- Aggeler J, Frisch SM, Werb Z. Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblasts. *J Cell Biol* 1984; 98: 1662-71
- Agnelli G. The pharmacological basis of thrombolytic treatment. In: Agnelli G (ed). *Thrombolysis yearbook*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1993: 25-51
- Alexander P. Extracellular Matrix Proteases and Protein Technical Guide. *Oncogene Research Products* 2002; 2: 1-19
- Almer L, Ohlin H. Elevated levels of the rapid inhibitor of plasminogen activator (tPA) in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1987; 47: 335-9
- American Fertility Society. Classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1979; 32: 633
- American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1985; 43: 351
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1-22
- Andrés C, Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J. Activadores fibrinolíticos e inhibidores de los activadores del plasminógeno durante la gestación normal. Correlación entre diversos parámetros fibrinolíticos. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 1989; 34: 48-53
- Angerer LM, Cox K, Angerer RC. Demonstration of tissue-specific gene expression by in situ hybridization. In: Berger SL, Kimmel AR (eds). *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*. San Diego, Academic Press Inc, 1987: 649-61
- Angerer LM, Angerer RC. Localization of mRNAs by in situ hybridization. *Meth Cell Biol* 1991; 35: 37-71
- Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE. The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1996; 65: 603-7
- Arumugam K, Lim JM. Menstrual characteristics associated with endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 948-50
- Astedt B, Holmberg L. Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* 1976; 261: 595-7
- Astedt B, Nordenskjold F. Plasminogen activators in endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 123; 23-4

- Ayers JWT, Friedman AP. Utero-tubal hypotonia associated with pelvic endometriosis. In Abstracts of the Scientific and Poster Sessions of the Forty-First Annual Meeting of the American Fertility Society, Chicago, IL, The American Fertility Society 1985; 131
- Aznar J, Estellés A, Tormo G, Sapena P, Tormo V, Blanch S, España F. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Brit Heart J* 1988; 59: 535-41
- Aznar J, Estellés A. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the pathogenesis of coronary artery disease. *Haemostasis* 1994a; 24: 243-50
- Aznar J, Girolami A, Vicente V. Hereditary and acquired thrombophilia. *Rev Invest Clin* 1994b; 67: 166-71
- Bachmann F, Kruithof EK. Tissue plasminogen activator, chemical and physiological aspects. *Semin Thromb Hemost* 1984; 10: 6-17
- Bachmann F. The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects. *Thromb Haemost* 1995; 74: 172-9
- Baird DT, Cameron ST, Critchley HO, Drudy TA, Howe A, Jones RL, Lea RG, Kelly RW. Prostaglandins and menstruation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996; 70: 15-7
- Baker ER, Mathur RS, Kirk RF, Williamson HO. Female runners and secondary amenorrhea: correlation with age, parity, mileage, and plasma hormonal and sex-hormone-binding globulin concentrations. *Fertil Steril* 1981; 36: 183-7
- Balasz J, Creus M, Fabregues F, Carmona F, Ordi J, Martinez-Roman S, Vanrell JA. Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum Reprod* 1996; 11: 387-91
- Batzofin JH, Holmes SD, Gibbons WE, Buttram VC Jr. Peritoneal fluid plasminogen activator activity in endometriosis and pelvic adhesive disease. *Fertil Steril* 1985; 44: 277-9
- Behrendt N, Ronne E, Ploug M, Petri T, Lober D, Nielsen LS, Schleuning WD, Blasi F, Dano K. The human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Biol Chem* 1990; 265: 6453-60
- Belaisch J, Audebert A, Brosens IA, Canis M, Leroy JL, Tran DK. Physiopatologie de l'endometriose. En : L'endometriose. Masson (ed), Paris, 1999: 13-24
- Bellingard V, Hedon B, Capony F, Defrenne A, Rochefort H, Maudelonde T. Identification of prometalloproteinase-3 as a major protein secreted by human endometrial fibroblasts and inhibited by cocultures with trophoblast cells. *Biol Reprod* 1996; 55: 604-12
- Bergqvist A, Jeppsson S, Kullander S, Ljungberg O. Human uterine endometrium and endometriotic tissue transplanted into nude mice. Morphologic effects of various steroid hormones. *Am J Pathol* 1985; 121: 337-41
- Bergqvist A, Ferno M. Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and

- endometrium: comparison of different cycle phases. *Hum Reprod* 1993; 8: 2211-7
- Berube S, Marcoux S, Maheux R. Characteristics related to the prevalence of minimal or mild endometriosis in infertile women. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *Epidemiology* 1998; 9: 504-10
- Bianchi E, Cohen RL, Thor AT, Todd RF 3<sup>rd</sup>, Mizukami IF, Lawrence DA, Ljung BM, Schuman MA, Smith HS. The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue. *Cancer Res* 1994; 54: 861-6
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197-250.
- Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982; 99: 31-68
- Bonewald LF. Regulation and regulatory activities of transforming growth factor  $\beta$ . *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999; 9: 33-44
- Bouchet-Bernet C, Spyrtos F, Andrieu C, Deytieux S, Becette V, Oglobine J. Influence of the extraction procedure on plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) and urokinase receptor (uPAR) assays in breast cancer tissues. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 41: 141-6
- Bouckaert PX, Evers JL, Doesburg WH, Schellenkens IA, Polland R. Patterns of changes in glycoproteins, polypeptides, and steroids in the peritoneal fluid of women during the periovulatory phase of menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 293-9
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267-83
- Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM, Osteen KG. Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7362-6
- Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2851-7
- Bruner-Tran KL, Keller NR, Osteen KG. Interleukin-1 alpha opposes suppression of human endometrial matrix metalloproteinases by progesterone in a model of experimental endometriosis. In: Understanding and managing endometriosis: Advances in Research and Practice. Parthenon (ed). Pearl River, NY. 1999: 123-30
- Bruner-Tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, McBean J, Osteen KG. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the

- establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4782-91
- Bruse C, Bergqvist A, Carlstrom K, Fianu-Jonasson A, Lecander I, Astedt B. Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril* 1998; 70: 821-6
- Buckman, RF, Woods M, Sargen L, Gervin AS. A unifying pathogenic mechanism in the etiology of intraperitoneal adhesions. *J Surg Res* 1976; 20: 1-5
- Bugge TH, Flick MJ, Danton MJ, Daugherty CC, Romer J, Dano K, Carmeliet P, Collen D, Degen JL. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5899-904
- Bulletti C, Jasonni VM, Polli V, Cappuccini F, Galassi A, Flamigni C. Basement membrane in human endometrium: possible role of proteolytic enzymes in developing hyperplasia and carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 376-82
- Bulletti C, De Ziegler D, Albonetti A, Flamigni C. Paracrine regulation of menstruation. *J Reprod Immunol* 1998; 39: 89-104
- Bullock JL, Massey FM, Gambrell RD. Symptomatic endometriosis in teen-agers: a reappraisal. *Obstet Gynecol* 1974; 43: 896-900
- Bulun SE, Zeitoun K, Takamaya K, Noble L, Michael D, Simpson E, Johns A, Putman M, Sasano H. Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis. *Endocrinol Relat Cancer* 1999; 6: 293-301
- Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Simpson E, Sasano H. Aromatase as a therapeutic target in endometriosis. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 22-7
- Campbell S, Cameron IT. The origins and physiology of menstruation. In: Clinical Disorders of the Endometrium and Menstrual Cycle. Cameron I, Fraser IS y Smith SK (eds). Oxford: Oxford University Press 1998, 13-30
- Cano A, Morcillo N, Lopez F, Marquina P, Parrilla JJ, Abad L. Cytoplasmic and nuclear estrogen binding capacity in the rat uterus during treatment with danazol and testosterone. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1986; 21: 245-52
- Carlstrom K, Bergqvist A, Ljungberg O. Metabolism of estrone sulphate in endometriotic tissue and in uterine endometrium in proliferative and secretory cycle phase. *Fertil Steril* 1988; 49: 229-33
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen

activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368: 419-24

- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiros, Lupu F, Collen D. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997; 17: 439-44
- Casey J, Davidson N. Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplex at high concentrations of formamide. *Nucl Acid Res* 1977; 4: 1539-47
- Casslen B, Thorell J, Astedt B. Effect of IUD on urokinase-like immunoreactivity and plasminogen activators in human uterine fluid. *Contraception* 1981; 23: 435-46
- Casslen B, Astedt B. Occurrence of both urokinase and tissue plasminogen activator in the human endometrium. *Contraception* 1983; 28: 553-64
- Casslen B, Andersson A, Nilsson I, Astedt B. Hormonal regulation of the release of plasminogen activators and of a specific activator inhibitor from endometrial tissue in culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 182: 419-24
- Casslen B, Urano S, Ny T. Progesterone regulation of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) antigen and mRNA levels in human endometrial stromal cells *Thromb Res* 1992a; 66: 75-87
- Casslen B, Urano S, Lecander , Ny T. Plasminogen activators in the human endometrium, cellular origin and hormonal regulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992b; 3:133-8
- Casslen B, Astedt B. Plasminogen activation in ovarian cancer. In: Fibrinolysis in disease. Gals-Greenwalt P (ed). Boca Raton, (FL): CRC Press 1995a: 31-40
- Casslen B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert ME, Lund LR. Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (uPA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the uPA receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995b; 80: 2776-83
- Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator Inhibitor type 1 (PAI-1) and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 (TIMP-1) gene expression in primary breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1288-95
- Chintala SK, Mohanam S, Go Y, Venkaiah B, Sawaya R, Gokeslan ZL, Rao JS. Altered in vitro spreading and cytoskeletal organization in human glioma cells by downregulation of urokinase receptor. *Mol Carcinog* 1997; 20: 355-65
- Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Polan ML. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic

- endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 2001; 75: 152-9
- Chung HW, Lee JY, Moon HS, Hur SE, Park MH, Wen Y, Polan ML. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. *Fertil Steril* 2002; 78: 787-95
- Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78: 3114-24
- Cox KE, Piva M, Sharpe-Timms KL. Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. *Biol Reprod* 2001; 65: 1297-303
- Coxhead D, Thomas EJ. Familial inheritance of endometriosis in a British population: a case control study. *J Obstet Gynecol* 1993; 12: 42-4
- Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MT, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Scoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 1986; 255: 1904-8
- Cullen TS. Adenomyoma of the round ligament. *Bull John Hopkins Hosp* 1896; 7: 112
- Curry TE Jr, Osteen KG. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 2001; 64: 1285-96
- Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139-266
- Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielezny MA, Michalek AM, Selman S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiology* 1993; 4: 135-42
- Dastre A. Fibrinolyse dans le sang. *Arch Norm Pathol* 1893; 5: 661-73
- Dizerega GS, Barber DL, Hodgen GD. Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance and suppression. *Fertil Steril* 1980; 33: 649-53
- Dmowski WP, Gebel HM, Braun DP. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994; 159: 7-14
- Dong JC, Dong H, Campana A, Bischof P. Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation. *Reproduction* 2002; 123: 621-31
- Dorgan JF, Reichman ME, Fudd JT, Brown C. The relationship of body size to plasma levels of estrogens and androgens in premenopausal women. *Cancer Causes Control* 1995; 6: 3-8
- Doty DW, Gruber JS, Wolf GC, Winslow RC. 46 XY pure gonadal dysgenesis: report of 2 unusual cases. *Obstet Gynecol* 1980; 55: 61S-65S

- Douglas DA, Shi YE, Sang QA. Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J Protein Chem* 1997; 16: 237-55
- Duggan C, Maguire T, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Duffy M. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 61: 597-600
- Duignan NH, Jordan JA, Coughlan BM, Logan-Edwards R. One thousand consecutive cases of diagnostic laparoscopy. *J Obstet Gynaecol* 1972; 79: 1016-20
- Dunselman GA, Bouckaert PX, Van Wersch JW, Brommer EJ, Evers JL. Fibrinolytic properties of peritoneal fluid in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1988; 26: 302-7
- Edelstam G, Lecander I, Larsson B, Astedt B. Fibrinolysis in the peritoneal fluid during adhesions, endometriosis and ongoing pelvic inflammatory disease. *Inflammation* 1998; 22: 341-51
- Eeckhout Y, Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein and spontaneous activation. *Biochem J* 1977; 166: 21-31
- Ehrlich HJ, Keijer J, Preissner KT, Klein Gebbink R, Pannekoek H. Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. *Biochemistry* 1991; 30: 1021-8
- El Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 137-40
- Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest* 1984; 74: 1465-72
- Eskenazi B, Warner M. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24: 235-58
- España F, Berrettini M, Griffin JH. Purification and characterization of plasma protein C inhibitor. *Thromb Res* 1989a; 55: 369-84
- España F, Estellés A, Gilabert J, Andrés C, Aznar J. Inhibidores de la proteína C. *Rev Iber Tromb Hemostasia* 1989b; 2: 29-32
- España F, Griffin JH. Determination of functional and antigen protein C inhibitor and its complexes with activated protein C in plasma by ELISA's. *Thromb Res* 1989c; 55: 671-82
- España F, J Gilabert, A Estellés, A Romeu, J Aznar, A Cabo. Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen. *Thromb Res* 1991; 64: 309-20
- España F, Estellés A, Fernández PJ, Gilabert J, Sánchez-Cuenca J, Griffin JH. Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and in blood plasma. *Thromb Haemostas* 1993a; 70: 989-94

- España F, Vicente V, Vázquez L, Estellés A, Sánchez-Cuenca J, Aznar J. Complex formation between protein C inhibitor and tissue plasminogen activator during trombolytic therapy. Evidence of activation of protein C pathway. *Fibrinolysis* 1993b; 7: 308-15
- España F, Sanchez-Cuenca J, Fernández PJ, Gilabert J, Romeu A, Estellés A, Royo M, Muller CH. Inhibition of human sperm-zone-free hamster oocyte binding and penetration by protein C inhibitor. *Andrologia* 1999; 31: 217-23
- Estellés A, Tormo G, Aznar J, España E, Tormo V. Reduced fibrinolytic activity in coronary heart disease in basal conditions and after exercise. *Thromb Res* 1985; 40: 373-83.
- Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Gómez-Lechón MJ. Fibrinolysis in preeclampsia. *Fibrinolysis* 1987; 1: 209-14
- Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR. Changes in plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* 1989a; 74: 1332-8
- Estellés A, Aznar J, Tormo G, Sapena P, Tormo V, España F. Influence of a rehabilitation sports programme on the fibrinolytic activity of patients after myocardial infarction. *Thromb Res* 1989b; 55: 203-12
- Estellés A, Gilabert J, Andres C, España F, Aznar J. Plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy. *Thromb Haemost* 1990; 64: 281-5
- Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Galbis M. Fibrinolytic parameters in normotensive pregnancy with intrauterine fetal growth retardation and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 138-42
- Estellés A, Gilabert J. Coagulopatías hereditarias. Biología y patología del sistema fibrinolítico. Bioquímica y función del plasminógeno. En: Enciclopedia Latinoamericana de Hematología 1992; 41
- Estellés A, Gilabert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, Grancha S, España F, Loskutoff DJ, Schleef RR. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood* 1994; 84: 143-50
- Estellés A, Grancha S, Gilabert J, Thinnés T, Chirivella M, España F, Aznar J, Loskutoff DJ. Abnormal expression of plasminogen activator inhibitors in patients with gestational trophoblastic disease. *Am J Pathol* 1996; 149: 1229-39
- Evans DM, McAree K, Guyton DP, Hawdins N, Stakleff K. Dose dependency and wound healing

- aspects of the use of tissue plasminogen activator in the prevention of intra-abdominal adhesions. *Am J Surg* 1993; 165: 229-32
- Evers JL, Dunselman GA, Linden PJ, Land JA. New concepts on the etiology of endometriosis. En: Fertility and sterility. A current overview. Hedon B, Bringer J, Mares P (eds). Montpellier, France: The Parthenon Publishing Group, 1995: 57-62
- Falk K, Bjorquist P, Stromqvist M, Holmdahl L. Reduction of experimental adhesion formation by inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1. *Br J Surg* 2001; 88: 286-9
- Farrar J, Carson D. Differential temporal and spatial expression of mRNA encoding extracellular matrix components in deciduas during the peri-implantation period. *Biol Reprod* 1992; 46: 1095-108
- Feinberg RF, Kao LC, Haimowitz JE, Queenan JT, Wun TC, Strauss JF 3rd, Kliman HJ. Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunochemical marker of invading trophoblasts. *Lab Invest* 1989; 61: 20-6
- Fernandez-Shaw S, Marshall J, Hicks B, Barlow D, Starkey P. Plasminogen activators in ectopic and uterine endometrium. *Fertil Steril* 1995; 63: 45-51
- Finlay TH, Katz J, Kirsch L, Levitz M, Nathoo SA, Seiler S. Estrogen stimulated uptake of plasminogen by mouse uterus. *Endocrinology* 1983; 112: 856-61
- Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview *EXS* 1997; 79: 1-8
- Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot-Applanat M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol Reprod* 1999; 61: 1070-82
- Fujii S. Secondary mullerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 219-25
- García CR, David SS. Pelvic endometriosis: infertility and pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 129: 740-5
- Garrido N, Albert C, Krussel JS, O'Connor JE, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Expression, production and secretion of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 by granulosa cells is comparable in women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76: 568-75
- Geiger M, Huber K, Wojta, Stingl L, España F, Griffin JH, Binder BR. Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo. *Blood* 1989; 74: 722-8
- Gilabert J, Estellés A, Cano A, España F, Barrachina R, Grancha S, Aznar J, Tortajada M. The effect of estrogen replacement therapy with or without progestogen on the fibrinolytic

- system and coagulation inhibitors in postmenopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1995a; 173: 1849-54
- Gilabert J, Estellés A, Grancha S, España F, Aznar J. Fibrinolytic system and reproductive process with special reference to fibrinolytic failure in preeclampsia. *Hum Reprod* 1995b; 10: 121-31
- Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 1516-22
- Giudice LC, Tazuke DI, Swiersz L. Status of current research on endometriosis. *J Reprod Med* 1998; 43: 252-62
- Gleeson N, Gonsalves R, Bonnar J. Plasminogen activator inhibitors in uterine and peritoneal fluids of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 47: 218-24
- Gogusev J, Bouquet de Joliniere J, Telvi L, Doussau M, du Manoir S, Stojkoski A, Levardon M. Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 821-7
- Golder JP, Stephens RW. Minactivin. A human monocyte product which specifically inactivates urokinase-type plasminogen activators. *Eur J Biochem* 1983; 136: 517-22
- Goldstein DP, deCholnoky C, Emans SJ, Leventhal JM. Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J Reprod Med* 1980; 24: 251-6
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-22
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; 389: 77-81
- Gottschalk C, Malberg K, Arndt M, Schmitt J, Roessner A, Schultze D, Kleinstein J, Ansorge S. Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis. *Adv Exp Med Biol* 2000; 477: 483-6
- Grancha S, Estellés A, Gilabert J, Chirivella M, España F, Aznar J, Loskutoff DJ. Decreased expression of PAI-2 mRNA and protein in pregnancies complicated with intrauterine fetal growth retardation. *Thromb Haemostas* 1996; 76: 791-7
- Groothuis PG, Koks CA, de Goeij AF, Dunselman GA, Arends JW, Evers JL. Adhesion of human endometrium to the epithelial lining and extracellular matrix of amnion in vitro: an electron microscopic study. *Hum Reprod* 1998; 13: 2275-81
- Groothuis PG, Koks CA, de Goeij AF, Dunselman GA, Arends JW, Evers JL. Adhesion of human endometrial fragments to peritoneum in vitro. *Fertil Steril* 1999; 71: 1119-24

- Guan YM, Carlberg M, Bruse C, Carlstrom K, Bergqvist A. Effects of hormones on uPA, PAI-1 and suPAR from cultured endometrial and ovarian endometriotic stromal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 389-97
- Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH. Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril* 1997; 68: 941-2
- Hampton AL, Salamonsen LA. Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation. *J Endocrinol* 1994; 141: 1-3
- Harbeck N, Kruger A, Sinz S, Kates RE, Thomssen C, Schmitt M, Janicke F. Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1-a multifaceted proteolytic factor. *Onkologie* 2001; 24: 238-44.
- Hasson HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J Reprod Med* 1976; 13: 13-7
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992; 298: 29-32
- Healthsquare website. New Media systems, LCC; 1997.
- Hebert CA, Baker JB. Linkage of extracellular plasminogen activator to the fibroblast cytoskeleton: colocalization of cell surface urokinase with vinculin. *J Cell Biol* 1988; 106: 1241-7
- Heeb MJ, España F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH. Immunological identity of heparine dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 1987; 262: 15813-6
- Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 741-6
- Higazi AA, Mazar A, Wang J, Reilly R, Henkin J, Kniss D, Cines D. Single-chain urokinase-type plasminogen activator bound to its receptor is relatively resistant to plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1996; 87: 3545-9
- Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterisation of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 216-22
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365-77

- 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: 2671-5
- Ho HN, Wu MY, Yang YS. Peritoneal cellular immunity and endometriosis *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 400-12
- Hoeffler H. Principles of in situ hybridization. In: Polak JM, McGee J (eds.). *In Situ Hybridization, Principles and Practice*. New York, Oxford, 1990: 15-30
- Holmdahl L, Eriksson E, Eridsson BI, Risberg B. Depression of peritoneal fibrinolysis during surgery is a local response to trauma. *Surgery* 1998; 123: 539-44
- Holmdahl L, Ivarsson LM. The role of cytokines, coagulation and fibrinolysis in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg* 1999; 165: 1912-9
- Holmes WE, Pennica D, Blaber M, Rey MW, Guenzler WA, Steffens GJ, Heyneker HL. Cloning and expression of the gene for pro-urokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1985; 3: 923-9
- Hornstein MD, Thomas PP, Gleason RE, Barbieri RL. Menstrual cyclicality of CA-125 in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58: 279-83
- Hoshiai H, Ishikawa M, Sawatari Y, Noda K, Fukaya T. Laparoscopic evaluation of the onset and progression of endometriosis. *Am J Obstet Gynaecol* 1993; 169: 714-9
- Huang JC, Papasakelariou C, Dawood MY. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65: 931-4
- Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong Y-K, Polan ML. Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1721-9
- Huber R, Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of  $\alpha$ -1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 1989; 28: 8951-66
- Huffman JW. External endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 62: 1243
- Ingber D. Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* 1991; 41: 236-41
- Irigoyen JP, Muñoz-Cánovas P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 104-32
- Iswasaki KI, Makino T, Maruyama T, Matsubayashi H, Nozawa S. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil* 1993; 38: 229-34

- James TW, Wagner R, White LA, Zwolak RM, Brinckerhoff CE . Induction of collagenase and stromelysin gene expression by mechanical injury in a vascular smooth muscle-derived cell line. *J Cel Physiol* 1993; 157: 426-37
- Janicke F, Schmitt M, Pache L. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Can Res Treat* 1993; 24: 195-208
- Jankun J, Merrick HW, Goldblatt PJ. Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers. *J Cell Biochem* 1993; 53: 135-44
- Jones RL, Kelly RW, Critchley HOD. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod* 1997; 12, 1300-6
- Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC, Aillaud MF, Ansaldi J, Philips-Joet C, Holvoet P, Serradimigni A, Collen D. Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemostas* 1987; 57: 67-72
- Kasai S, Arimura H, Nishida M, Suyama T. Proteolytic cleavage of single-chain pro-urokinase induces conformational change which follows activation on the zymogen and reduction of its high affinity for fibrin. *J Biol Chem* 1985; 260: 2377-81
- Kirkland J, Murthy L, Stancel G. Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinology* 1992; 130: 3223-30
- Kistner RW, Swgler AM, Beriman SJ. Suggested classification for endometriosis; relationship to infertility. *Fertil Steril* 1977; 28: 1008-10
- Kleinert DE, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 891-7.
- Kleppinger RK. One thousand laparoscopies at a community hospital. *J Reprod Med* 1976; 13: 13-7
- Knapp VJ. How old is endometriosis? Late 17th-and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertil Steril* 1999; 72: 10-4
- Kobayashi H. Invasive capacity of heterotopic endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50: 26-32
- Koh SC, Wong PC, Yuen R, Chua SE, Ng BL, Ratnam SS. Concentration of plasminogen activators and inhibitor in the human endometrium at different phases of the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 407-13

- Kokorine I, Nissole M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril* 1997; 68: 246-51
- Koks CA, Groothuis PH, Dunselman GA, de Goeij AF, Eers JL. Adhesion of shed menstrual tissue in an in vitro model using amnion and peritoneum: a light and electron microscopic study. *Hum Reprod* 1999; 14: 816-22
- Koks CA, Groothuis PG, Slaats P, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. *Fertil Steril* 2000; 73: 604-12
- Koninckx PR, Meuleman C, Oosterlinck D, Cornillie FJ. Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma CA-125. *Fertil Steril* 1996; 65: 280-7
- Kruithof EK, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J Biol Chem* 1986; 261: 11207-13
- Kruithof EK, Tran-Thang C, Gudinchet A, Havert J, Nicoloso G, Genton C, Welti H, Bachmann F. Fibrinolysis in pregnancy: A study of plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69: 460-6
- Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995; 86: 4007-24.
- Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, de Ronde IJ, Jap PH, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55: 297-303
- Kumar S, Baglioni C. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity by overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2. *J Biol Chem* 1991; 266: 20960-4
- Lai HS, Chen Y, Chang KJ, Chen WJ. Tissue plasminogen activator reduces intraperitoneal adhesion after intestinal resection in rats. *J Formos Med Assoc* 1998; 97: 323-7
- Laiho M, Keski-Oja J. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 2533-5
- Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvas Res* 1998; 55: 29-42
- Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix associated protein with a

- distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 9352-60
- Leco KJ, Apte S, Taniguchi GT, Hawkes SP, Khokha R, Schultz GA, Edwards DR. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP- 4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 1997; 401: 213-7
- Lijnen HR, Collen D. Regulation of the fibrinolytic system. In: Agnelli G (ed). *Thrombolysis Yearbook*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1993: 1-23
- Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936: 226-36
- Littlefield BA. Plasminogen activators in endometrial physiology and embryo implantation. A review. *Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 166-75
- Liu YX. Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Biol Signals Recept* 1999; 8: 160-77
- Lockwood CJ, Krikun G, Papp C, Aigner S, Schatz F. Biological mechanisms underlying the clinical effects of RU 486: modulation of cultured endometrial stromal cell plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1100-5
- Lockwood CJ, Krikun G, Hausknecht VA, Papp C, Schatz F. Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progesterin-initiated decidualization and menstruation-related progesterin withdrawal. *Endocrinology* 1998; 139: 4607-13
- Long A, Mueller J, Andre-Schwartz J. High specificity in situ hybridization. Methods and applications. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 45-57
- Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence DA. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2956-60
- Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J. Type 1 plasminogen activator. En: *Progress in Hemostasis and Thrombosis*. Coller B. (ed). Philadelphia, PA, WB Saunders Co, 1988: 87-115
- Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis* 1991; 5: 197-206
- Maatta M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmanen H. Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial adenocarcinomas is associated with low differentiation. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 402-11
- Maeda N, Izumiya C, Oguri H, Kusume T, Yamamoto Y, Fukaya T. Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: 679-83

- Mahmood TA, Templeton A. Prevalence and genesis of endometriosis. *Hum Reprod* 1991; 6: 544-9
- Mahnke JL, Dawood MY, Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin 6 in peritoneal fluid of women with endometriosis *Fertil Steril* 2000; 73: 166-70
- Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinase-A and gelatinase-B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11789-93
- Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9120-5
- Markee JE. Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. Contributions to embryology. *Embriology* 1940; 177: 220-30
- Martelli M, Campana A, Bischof P. Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 67-76
- Martinez-Román S, Balasch J, Creus M, Fabregues F, Carmona F, Vilella R, Vanrell JA. Transferrin receptor (CD71) expression in peritoneal macrophages from fertile and infertile women with and without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 413-7
- Martins-Green M, MF Bissel. Cell-extracellular matrix interactions in development. *Semin Dev Biol* 1995; 6: 149-59
- Matorras R, Rodriguez J, Pijoan J, Ramon O, Gutierrez de Teran T, Rodríguez-Escudero F. Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril* 1995; 63: 34-8
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 1990; 12: 121-25.
- Matrisian LM, Gaire M, Rodgers WH, Osteen KG. Metalloproteinase expression and hormonal regulation during tissue remodeling in the cycling human endometrium. In: Hayashi K (ed.), *Extracellular Matrix in the Kidney*. Basel: Karger; 1994: 94-100
- Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, Okumara H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47: 18-22
- Mazar AP. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs* 2001; 12:387-400
- McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis *Human Reprod Update* 2000; 6: 45-55

- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl Acid Res* 1984; 12: 7035-56
- Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 94: 780-2
- Meyer R. Über eine adenomatöse Wucherung der Serosa in einer Bauchnarbe. *Z Geburtsh Gynakol* 1903; 49: 32-41
- Mignati P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161-95
- Mimuro J, Schleef RR, Loskutoff DJ. Extracellular matrix of cultured bovine aortic endothelial cells contains functionally active type 1 plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987; 70: 721-8
- Miyamoto S, Katz BZ, Lafrenie RM, Yamada KM. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1998; 857:119-29
- Mizukami IF, Faulkner NE, Gyetko MR, Sitrin RG, Todd RF 3rd. Enzyme-linked immunosorbent assay detection of a soluble form of urokinase plasminogen activator receptor in vivo. *Blood* 1995; 86: 203-11
- Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992; 72: 560-4
- Moen MH, Schei B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian county. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76: 559-62
- Moorman AF, De Boer PA, Vermuellen JL. Practical aspects of radioisotopic in situ hybridization on RNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 25: 251-66
- Murphy AA, Green WR, Boddie D, de la Cruz ZC, Rock JA. Unsuspected endometriosis documented by scanning electron microscopy in visually normal peritoneum. *Fertil Steril* 1986; 46: 522-4
- Murphy AA, Nisolle M, Berliere M, Paindaveine B, Casnas-Roux F, Bourdon A, Donnez J. Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women. *Fertil Steril* 1990; 53: 984-8
- Murphy G, Knäuper V, Cowell S, Hembry RM, Stanton H, Butler G, Freije JMP, Pendas AM, Lopez-Otin C. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 25-39
- Murphy G, Knäuper V, Atkinson A, Gavrilovic J, Edwards D. Cellular mechanisms for focal proteolysis and the regulation of the microenvironment. *Fibrinol Proteol* 2000; 14: 165-74

- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60
- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4
- Nakamura M, Katabuchi H, Tohya T, Fukumatsu Y, Matsuura K, Osamura H. Scanning electron microscopic and immunohistochemical studies of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 1993; 8: 2218-26
- Navarro J, Garrido N, Remohí J, Pellicer A. How does endometriosis affect infertility? *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30: 181-92
- Niedbala MJ, Sartorelli A. Regulation by epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediated proteolysis of extracellular matrix. *Cancer Res* 1989; 49: 3302-9
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25
- Ny T, Peng XR, Ohlsson M. Hormonal regulation of the fibrinolytic components in the ovary. *Thromb Res* 1993; 71: 41-5
- 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: 290-5
- 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* 1994a; 31: 25-31
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR. Transforming growth factor  $\beta$  activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1994b; 83: 287-92
- Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Human Reprod Update* 1996; 2: 385-98
- Orfeo T, Shatos MA, Stump DC. Activation of plasminogen (PA) by single-chain urokinase-type plasminogen activator (scuPA): kinetic analysis in the presence of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Fibrinolysis* 1990; 4: 161
- Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JT, Gorstein F, Matrisian LM. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of matrix metalloproteinase expression in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10129-33
- Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48: 2-13

- Palmieri D, Lee JW, Juliano R L, Church FC. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 40950-7
- Parazzini F, Ferraroni M, Feldele L, Boccione L, Ruberso S, Ricardi A. Pelvic endometriosis: reproductive and menstrual risk factors at different stages in Lombardy, Northern Italy. *J Epid Community Health* 1995; 49:61-4
- Parrilla JJ, Aznar J, Díez E. Actividad fibrinolítica del endometrio. *Tokoginecol Pract* 1972; 31: 391
- Parrilla JJ, Aznar J, Estellés A. Fibrinolytic activity in the endometrial adenocarcinoma. *Thromb Diath Haemorrh* 1975a; 34: 864-6
- Parrilla JJ, Aznar J, Estellés A, Díez E, Gilabert J. Fibrinolytic activity of human endometrium saline extract. *Sangre* 1975b; 20: 206-10
- Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 1992; 267: 17321-6
- Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, García-Velasco JA, Remohí J, Simón C. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 122-30
- Pepper MS, Sappino AP, Stocklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J Cell Biol* 1993; 122: 643-8
- Petit Cabello J, Gine Martinez L, Miralles RM, Valls Porcel M, Balaguero Llado L. Valor de la laparoscopia en el estudio de las algias pélvicas. *Acta Ginecol* 1986; 43: 357-63
- Pittaway DE, Favez JA. The use of CA-125 in the diagnosis and management of endometriosis. *Fertil Steril* 1986; 46: 790-5
- Plow EF, Felez J, Miles LA. Cellular Regulation of Fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1991; 66: 32-6
- Pollanen J, Hedman K, Nielsen LS, Dano K, Vaheri A. Ultrastructural localization of plasma membrane-associated urokinase-type plasminogen activator at focal contacts. *J Cell Biol* 1988; 106: 87-95
- Ponce M, Nomizu MC, Delgado Y, Kuratomi MP, Hoffman S, Powell Y, Yamada HK, Kleinman KM. Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma-1 chain. *Circ Res* 1999; 84: 688-94
- Pyke C, Eriksen H, Solberg B, et al. An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor of urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett* 1993; 326: 69-74

- Raiter-Tenenbaum A, Baranao RI, Etchappareborda JJ, Meresman GF, Rumi LS. Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 1998; 261: 147-57
- Rawdanowicz TJ, Hampton AL, Nagase H, Woolley DE, Salamonsen LA. Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 530-6
- Redwine DB. Invisible microscopic endometriosis: A review. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 55: 63-7
- Revised American Society for Reproductive Medicine. Classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67: 817-21
- Richter O, Mallmann P, Van Der Ven H, Krebs D. TNF-alpha secretion by peritoneal macrophages in endometriosis. *Zentralbl Gynakol* 1998; 20: 332-6
- Riis P. Editorial: Helsinki declaration II. *Ugerskr Laeger* 1976; 138: 443-4
- Robbins KC. Dysplasminogenemias. *Prog Cardiovas Dis* 1992; 34: 295-308
- Roberts DK, Parmley TH, Walker NJ, Horbelt DV. Ultrastructure of the microvasculature in the human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1393-406
- Rock JA, Prendergast RA, Bobbie D, Green WR, Parmley TH, Dubin NH. Intraocular endometrium in the rabbit as a model for endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 58: 232-5
- Rodgers WH, Osteen KG, Matrisiann LM, Navre M, Giudice LC, Gorstein F. Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 253-60
- Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994; 94: 946-53
- Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K, Appella E, Blasi F. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 1990; 9: 467-74.

- Rudolph-Owens L, Slayden OD, Matrisian LM, Brenner RM. Matrix metalloproteinase expression in *Macaca Mulatta* endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients. *Biol Reprod* 1998; 59:1349-59
- Ruiz MA, Marugán A, Estellés A, Navarro I, España F, Alberola V, San Juan L, Aznar J, García-Conde J. The influence of chemotherapy on plasma coagulation and fibrinolytic systems in lung cancer patients. *Cancer* 1989; 63: 643-8
- Ruiz Navas MT, Lopez Lopez E, Forcen LM, Messenger Peña F, Bolea T, Abad Marínez L, Parrilla JJ. Adherencias y fertilidad posterior. *Rev Esp Obstet Ginecol* 1986; 45: 383-9
- Russell WW. Aberrant portions of the Mullerian duct found in an ovary. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1899; 94-96: 8-10
- Rybo G. Plasminogen activators in the endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1966; 45: 87-118
- Saito T, Mizumoto H, Kuroki K, FujiiMori S, Kudo R. Expression of MMP-3 and TIMP-1 in the endometriosis and the influence of danazol. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 47: 495-6
- Saksela O, Rifkin DB. Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 1990; 110: 767-75
- Salamanca A, Beltran E. Subendothelial contractibility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 65: 193-5
- Salamonsen LA, Woolley DE. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod* 1996; 11: 124-33
- Salamonsen LA, Butt A, Hammond FR, Garcia S, Zhang J. Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1409-15
- Salamonsen LA, Woolley DE. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol* 1999a; 44: 1-27
- Salamonsen LA. Current concepts of the mechanisms of menstruation. *Baillier clinic Obstet Gynaecol* 1999b; 13: 161-79
- Salo T, Makelan M, Kylmaniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; 70: 176-82
- Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, Torregrosa G, Alborch E. Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entryinhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21:422-9

- Sampson JA. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. Their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type ("adenomyoma" of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid, etc.). *Arch Surg* 1921; 3: 245-323
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-69
- Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1940; 40: 549-57
- Sanfilippo JS, Wakin NG, Schikler KN, Yussman MA. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 39-43
- Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN. Epidemiology of endometriosis among porous women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 983-92
- Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassalli JD. Plasminogen activators in tissue remodelling and invasion: localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol* 1989; 109: 2471-9
- Satoh T, Kobayashi K, Yamashita S, Kikuchi M, Sendai Y, Hoshi H. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo. *Biol Reprod* 1994; 50: 835-44
- Schatz F, Lockwood CJ. Progestin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 621-5
- Schatz F, Papp C, Toth-Pal E, Lockwood CJ. Ovarian steroid-modulated stromelysin-1 expression in human endometrial stromal and decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1467-72
- Schatz F, Aigner S, Papp C, Toth-Pal E, Hausknecht V, Lockwood CJ. Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2504-10
- Schuklenk U. Helsinki Declaration: proposed revision. *Bull Med Ethics* 1999; 149: 2.
- Schwartz BS, España F. Two distinct urokinase-serpin interactions regulate the initiation of cell surface-associated plasminogen activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 15278-83
- Schwarzbauer JE. Fibronectin: from gene to protein. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3: 786-91
- Schwarzbauer JE. Basement membranes: putting up the barriers. *Curr Biol* 1999; 9: 242-4
- Segars JH. Endometriosis and nuclear hormone receptors. In: Endometrium and endometriosis. Blackwell Science (ed). Malden, MA 1997: 321-32
- Seiffert D, Keeton M, Eguchi Y, Sawdey M, Loskutoff DJ. Detection of vitronectin mRNA in tissue and cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9402-6

- Senturk LM, Arici A. Immunology of endometriosis. *J Reprod Immunol* 1999; 43: 67-83
- Sharpe-Timms KL, Penney LL, Zimmer RL, Wright JA, Zhang Y, Surewicz K. Partial purification and amino acid sequence analysis of endometriosis protein-II (ENDO-II) reveal homology with tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3784-7
- Sharpe-Timms KL. Basic research in endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24: 269-90
- Sharpe-Timms KL, Keisler L, McIntush E, Keisler K. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations are attenuated in peritoneal fluid and sera of women with endometriosis and restored in sera by gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Fertil Steril* 1998a; 69: 1128-34
- Sharpe-Timms KL, Zimmer RL, Jolliff WJ, Wright JA, Nothnick WB, Curry TE. Gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) therapy alters activity of plasminogen activators, matrix metalloproteinases, and their inhibitors in rat models for adhesion formation and endometriosis: potential GnRH-a-regulated mechanisms reducing adhesion formation. *Fertil Steril* 1998b; 69: 916-23
- Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 943: 131-47
- Sharpe-Timms, Cox K. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 147-56
- Signorello LB, Harlow BL, Cramer DW, Spiegelman D, Hill JA. Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study. *Ann Epidemiol* 1997; 7: 267-74
- Sillem M, Prifti S, Monga B, Buvari P, Shamia U, Runnenbaum B. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is overexpressed in uterine endometrium from women with endometriosis. *Mol Hum Rep* 1997; 12: 1101-5
- Sillem M, Prifti S, Koch A, Neher M, Jauckus J, Runnebaum B. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95: 167-74
- Simón C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin 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: 725-9
- Singer C, Marbaix E, Lemoine P, Courtoy PJ, Eeckhout Y. Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts. *Eur J Biochem* 1999; 259: 40-5

- Smith SK. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 147-51
- Soszka T, Olsewski K. Plasminogen activators and their inhibitors in normal, hyperplastic and carcinomatous human endometrium. *Thromb Res* 1986; 42: 835-46
- Sprengers ED, Akkerman JW, Jansen BG. Blood platelet plasminogen activator inhibitor: two different pools of endothelial cell type plasminogen activator inhibitor in human blood. *Thromb Haemost* 1986; 55: 325-9
- Spuijbroek MD, Dunselman GA, Menheere PP, Evers JL. Early endometriosis invades the extracellular matrix. *Fertil Steril* 1992; 58: 929-33
- Stefansson H, Geirsson RT, Steinthorsdottir V, Jonsson H, Manolescu A, Kong A, Ingadottir G, Gulcher J, Stefansson K. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17: 555-9
- Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ. Endometriosis and infertility: a laproscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril* 1982; 38: 667-72
- Stripling MC, Martin DC, Chartman DC, Zwaag RV, Posten WM. Subtle appearances of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 49: 427-33
- Stump DC, Thienpot M, Collen D. Purification and characterization of a novel inhibitor of urokinase from urine. Quantitation and preliminary characterization in plasma. *J Biol Chem* 1986a; 261:12759-66
- Stump DC, Lijnen HR, Collen D. Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1986b; 261: 17120-6
- Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S, Kamiya T, Saito H. normal titer of functional immunoreactive protein C inhibitor in plasma of patients with congenital combined deficiency of factors V and factor VIII. *Blood* 1983; 1266-70
- Szamatowicz J, Laudanski P, Tomaszewska I. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17: 284-8
- Taberero MD, Estellés A, Vicente V, Alberca I, Aznar J. Incidence of increased plasminogen activator inhibitor in patients with deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism. *Thromb Res* 1989; 56: 565-70
- Taberero MD, España F, Vicente V, Estellés A, Gilabert J, Aznar J. Protein C inhibitor and other components of the protein C pathway in patients with acute deep vein thrombosis during heparin treatment. *Thromb Haemostas* 1990; 63: 380-2

- Tabibzadeh S. Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1992; 7: 876-82
- Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 77-92
- Talhok RS, Bissell MJ, Werb Z. Coordinate expression of extracellular matrix degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 1992; 118: 1271-82
- Tomás Martínez JF, Alberca I, Tabernero MD, Vicente V. Hemostasis in malignancy. *Am J Hematol* 1991; 38: 337-8
- Topley N, Mackenzie RK, Williams JD. Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. *Immunobiology* 1996; 95: 563-73
- Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 655-709
- Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1118-22
- Tsuji K, Eguchi Y, Kodama M. Postoperative hypercoagulable state followed by hyperfibrinolysis related to wound healing alters hepatic resection. *J Am Coll Surg* 1996; 183: 230-8
- Tucker HM, Mottonen J, Goldsmith EJ, Gerard RD. Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition. *Nat Struct Biol* 1995; 2: 442-5
- Ueki M, Saeki M, Tsurunaga T, Ueda M, Ushironaga N, Sugimoto O. Visual findings and histological diagnosis of pelvic endometriosis under laparoscopy and laparotomy. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995; 40: 248-53
- Van der Linden PJ, Erkens HW, De Goeij AF, Evers JL, Duslman GA. Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes. *Fertil Steril* 1996; 65: 76-80
- Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991; 5: 2814-23
- Van Doren SR, Kurochkin AV, Hu WD, Ye QZ, Johnson LL, Hupe DJ, Zuiderweg ERP. Solution Structure of the Catalytic Domain of Human Stromelysin Complexed with a Hydrophobic Inhibitor. *Protein Sci* 1995; 4: 2487-98
- Van Meijer M, Pannekoek H. Structure of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 1995; 9: 263-76
- Vassalli JD, Sappino AP, Belin DJ. The plasminogen activator/plasmin system. *Clin Invest* 1991; 88: 1067-72

- Vercellini P, De Giorgio O, Aimi G, Panbazza S, Uglietti A, Crosignani PG. Menstrual characteristics in women with and without endometriosis. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 264-8
- Vercellini P, Aimi G, De Giorgio O, Maddalena S, Carinelli S, Crosignani PG. Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105: 1018-21
- Vicente V, Rodriguez C, Soto I, Fernandez M, Moraleta JM. Risk of thrombosis during pregnancy and post-partum in hereditary thrombophilia. *Am J Hematol* 1994; 46: 151-2
- Von Rokitsansky C: Zesch. Gesselsch. *AERTZ* 1860; 16: 577
- Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Cir Res* 1998; 83: 832-40
- Waterhouse P, Denhardt DT, Khokha R. Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 219-26
- Wenzl RJ, Heinzl H. Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 45: 253-7
- Werb Z, Cu TH, Rinkenberger JL, Coussens LM. Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation. *APMIS* 1999; 107: 11-8
- Wicks MJ, Larson CP. Histologic criteria for evaluating endometriosis. *Northwest Med* 1949; 48: 611-7
- Wilcox JN. Fundamental principles of in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1725-34
- Wilex AG. Clinical Research Unit of München University. *Website* 2003
- Wild RA, Zhang RJ, Medders D. Whole endometrial fragments from characteristics of in vivo endometriosis in a mesothelial cell co-culture system: an in vitro model for the study of the histogenesis of endometriosis. *J Gynecol Invest* 1994; 1: 65-8
- Witz CA, Thomas MR, Montoya-Rodriguez IA, Nair AS, Centonze VE, Schencken RS. Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. *Fertil Steril* 2001; 75: 385-90
- Woessner JF Jr. Regulation of matrix metalloproteinases in the rat uterus. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 777-84
- Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB* 1991; 5: 2145-54
- Zeitoun KM, Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril* 1999; 72: 961-9

- Zhang J, Nie G, Jian W, Woolley DE, Salamonsen LA. Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation. *Biol Reprod* 1998; 59: 693-703
- Zhu H, Huang J, Mazela J, Elias J, Tseng L. Progestin stimulates the biosynthesis of fibronectin and accumulation of fibronectin mRNA in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 1992; 7: 141-6