



UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL
Programa de Doctorado en
Biomedicina

**Caracterización fenotípica y funcional de las
células endometriales estromales humanas y su
implicación en la etiopatogenia de la
endometriosis**

DOCTORANDO
Jose María Puerta Sanabria

Directoras
María Jose Ruiz Magaña
María del Carmen Ruiz Ruiz

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José maría Puerta Sanabria
ISBN: 978-84-1117-881-5
URI: <https://hdl.handle.net/10481/82232>



AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mis abuelos, porque soy lo que soy gracias a ellos.

A mis hermanos, por obligarme a superarme para tratar de ser un ejemplo para ellos.

A Macarena y a Pepito por ser mi apoyo, mi calma y mi alegría.

A Jose Antonio y a Enrique, por meterme en toda esta historia, por confiar en mi yo de hace 10 años.

Pero sobre todo a Maria José y a Mari Carmen, por haberse cruzado en mi camino, por enseñar a un médico a usar pipetas y citómetros, por aguantar mis despistes siempre con una sonrisa, por haberme hecho Doctor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	6
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	11
CONCEPTO	12
HISTORIA DE LA ENDOMETRIOSIS	12
EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS	13
Factores de Riesgo.....	13
ETIOPATOGENIA DE LA ENDOMETRIOSIS.....	15
1) Origen de la endometriosis de endometrio uterino	15
2) Origen de la endometriosis de endometrio extrauterino.....	16
ESTABLECIMIENTO DE LA ENFERMEDAD	18
Predisposición genética	18
Dependencia hormonal	20
Resistencia a progesterona.....	20
Factores inmunológicos	21
ASPECTOS CLÍNICOS Y TERAPÉUTICOS DE LA	
ENDOMETRIOSIS	24
Anatomía patológica	24
Clasificación.....	25
Clínica de la endometriosis	28
Diagnóstico de la endometriosis	29
Tratamiento de la endometriosis	31
Cirugía de la endometriosis.....	33
ENDOMETRIOSIS Y APOPTOSIS.....	42
ANTECEDENTES: TIPOS CELULARES	44
Células deciduales/endometriales estromales	44
Célula madre mesenquimal (MSC).....	46
Endometriosis y relación con la célula madre mesenquimal (MSC) ..	46
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
MATERIAL Y MÉTODOS	51
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	52
Pacientes con endometriosis	52
Donantes sanas	53
Resumen de las muestras obtenidas	54



AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	55
ANÁLISIS DEL FENOTIPO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .	57
DECIDUALIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES.....	60
ANÁLISIS MORFOLÓGICO	61
DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	61
RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	62
ENSAYO DE INVASIÓN O CIERRE DE LA HERIDA.....	65
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR	66
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
<i>RESULTADOS.....</i>	<i>68</i>
Datos epidemiológicos	69
Donantes con endometriosis	69
Donantes sanas	70
Establecimiento de líneas celulares.....	70
Las células endometriales estromales del tejido endometrial ectópico y eutópico exhiben un fenotipo antigénico similar	72
Efectos de la decidualización sobre el fenotipo y la supervivencia de EnSC de mujeres con endometriosis	77
Efectos de la decidualización sobre la capacidad de migración de las EnSC eutópicas y ectópicas	86
<i>DISCUSIÓN.....</i>	<i>95</i>
<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>106</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	<i>108</i>



ÍNDICE ABREVIATURAS

- α -SM actina:** Alpha smooth muscle actin o actina de músculo liso
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ASRM:** American Society for Reproductive Medicine
- BCL:** Proteína linfoma de células B
- BEnSC:** Célula endometrial estromal procedente de biopsia endometrial de donantes sanas
- BSA:** Albúmina de suero bovino
- CM:** Medio condicionado
- CM-D:** Medio condicionado de células decidualizadas
- CM-U:** Medio condicionado de células no decidualizadas
- CO₂:** Dióxido de carbono
- CSF:** Factores estimulantes de colonias
- DSC:** Células deciduales estromales
- eBEnSC:** Célula endometrial estromal procedente de biopsia endometrial de donantes con endometriosis
- eEnSC:** Célula endometrial estromal procedente de paciente con endometriosis
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EnSC:** Célula endometrial estromal
- ESHRE:** European Society of Human Reproduction and Embriology
- FBS:** Suero fetal bovino
- FITC:** Isocionato de fluoresceína
- GAPDH:** Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa



HLA-G: Antígeno leucocitario humano G.

Ig: Inmunoglobulina

IGFBP: Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina

IL: Interleuquina

LIF: Factor inhibidor de leucemia

MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos

mEnSC: Célula endometrial estromal procedente de sangre menstrual

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MSC: Célula mesenquimal estromal

NK: Célula *natural killer*

OR: Odds ratio

P4: Progesterona

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDPN: Podoplanina

PGE2: Prostaglandina E2

PRL: Prolactina

RANTES: Citoquina de regulación por activación de linfocitos T

Rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

SEM: Error estándar de la media

STRO-1: Antígeno de superficie del precursor de células estromales 1

SUSD2: Sushi domain containing 2

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

UCB-MSC: MSC de sangre de cordón umbilical

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	26
Figura 2	27
Figura 3	35
Figura 4	36
Figura 5	37
Figura 6	38
Figura 7	39
Figura 8	40
Figura 9	57
Figura 10	66
Figura 11	71
Figura 12	73
Figura 13	74
Figura 14	76
Figura 15	77
Figura 16	78
Figura 17	79
Figura 18	80
Figura 19	81



Figura 20	82
Figura 21	84
Figura 22	85
Figura 23	85
Figura 24	88
Figura 25	89
Figura 26	90
Figura 27	91
Figura 28	93
Figura 29	94

TABLAS

Tabla 1	32
Tabla 2	60
Tabla 3	63
Tabla 4	64
Tabla 5	64
Tabla 6	75

RESUMEN

La endometriosis es una patología que se define como la presencia de glándulas endometriales funcionales y estroma fuera de la cavidad uterina. Se estima que afecta a un 10% de la población general, aunque su prevalencia es aún mayor en pacientes estériles. Aunque la endometriosis sigue siendo una enfermedad enigmática, se han propuesto varias teorías para explicar su etiología. La más aceptada en la actualidad es la de la menstruación retrógrada, aunque la presencia de endometriosis en localizaciones como el pulmón o la piel ponen en duda esta teoría. Por otro lado, la teoría de la localización anómala o *homing* erróneo afirma que las células madre circulantes (células madre mesenquimales/estromales-MS-C-) de la médula ósea y los precursores relacionados con las MSC de la capa endometrial podrían diferenciarse a tejido endometrial en diferentes órganos, incluso en ubicaciones diferentes al propio endometrio.

Existen múltiples estudios que han establecido diferencias entre las células endometriales estromales (EnSC) de localización eutópica y las de localización ectópica en pacientes con endometriosis, aunque a día de hoy aún se desconoce si las alteraciones detectadas en las EnSC de focos de endometriosis son constitutivas, y están presentes en el endometrio eutópico, o son inducidas o adquiridas en la localización ectópica.

Nuestro estudio profundiza en este tema focalizándose en los siguientes aspectos:

- El análisis fenotípico comparativo de líneas celulares de EnSC obtenidas a partir de muestras de endometrio eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis, y de muestras de endometrio y de

sangre menstrual de donantes sanas, siendo el primer estudio comparativo que se lleva a cabo con estos cuatro tipos de líneas celulares.

- Ahondar en las diferencias que existen en el proceso de decidualización entre las EnSC de origen eutópico y ectópico, en cuanto a su capacidad de sufrir cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales durante dicho proceso.

Los resultados de este trabajo indican que el fenotipo de las células de focos de endometriosis es similar al de EnSC eutópicas, presentando todas ellas marcadores típicos de células mesenquimales estromales (MSC), y siendo la expresión de algunos de estos marcadores más elevada únicamente en EnSC procedentes de sangre menstrual. Por el contrario, las células ectópicas presentan resistencia al proceso de decidualización in vitro con progesterona y AMPc, de manera que, a diferencia de lo observado en células eutópicas (de pacientes y donante sanas), en respuesta a la decidualización no sufren cambios morfológicos ni en la expresión de antígenos, no expresan prolactina y, aunque parecen secretar factores inhibidores de la migración celular, presentan menor capacidad para ello que las células eutópicas. Curiosamente, las EnSC de donantes sanas mueren por apoptosis durante el proceso de decidualización. Sin embargo, hemos observado que tanto las células ectópicas como las eutópicas de pacientes con endometriosis son resistentes a este proceso de inducción de apoptosis. Estos resultados nos llevan a concluir que las células endometriales eutópicas de mujeres con endometriosis pueden presentar alteraciones en algunos fenómenos asociados a la decidualización, como la inducción de apoptosis. Sin embargo, las células ectópicas de estas pacientes deben sufrir cambios adicionales en los focos endometriósicos que les hacen presentar las diferencias con respecto a las eutópicas que hemos hallado, cambios probablemente derivados de su interacción con el microambiente



en la ubicación ectópica, que contribuyen, entre otras cosas, a la adquisición de su alta resistencia a la decidualización y a la apoptosis.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

INTRODUCCIÓN



CONCEPTO

La endometriosis es una enfermedad que se define como la presencia de glándulas endometriales funcionales y estroma fuera de la cavidad uterina, siendo los lugares más comunes para la aparición de implantes endometriales ectópicos los ovarios, los ligamentos úterosacros y el fondo de saco vaginal posterior, apareciendo de forma menos habitual en localizaciones como la vejiga, la pleura o el pericardioⁱ. Existe, por otra parte, una forma específica de endometriosis conocida como adenomiosis, que se define como la presencia de estos implantes en el espesor del miometrio uterino.

Se trata de una patología debilitante con características propias de la inflamación crónica y que se comporta en algunos aspectos de forma similar a las neoplasias malignas, presentando: un crecimiento progresivo e invasivo dependiente de hormonas, así como altas tasas de recurrencia y tendencia a aparición en órganos a distancia del primario afecto, similar a una metástasisⁱⁱ.

HISTORIA DE LA ENDOMETRIOSIS

La primera referencia a la endometriosis aparece en 1690, cuando Daniel Shroen describe la presencia de unas “úlceras” diseminadas por el abdomen, que aparecían sólo en mujeres en edad reproductivaⁱⁱⁱ. Sin embargo, la primera mención al término endometriosis la hizo el patólogo alemán Frederich Daniel von Recklinghausen en 1885. Por otro lado, la primera descripción patológica la hizo el anatomopatólogo Kart Freiherr von Rokitansky.

En 1921, John Albertson Sampson^{iv} inicia sus publicaciones sobre endometriosis, desarrollando posteriormente la teoría de la “menstruación retrógrada” como la causa más probable.

En el transcurso de los años, se han desarrollado diferentes teorías en un intento de explicar el origen de la enfermedad; sin embargo, aún en la actualidad, la endometriosis sigue siendo una enfermedad enigmática.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS

La prevalencia de la endometriosis es muy variable según las diferentes publicaciones, aunque se estima en un 10% de la población general^v. Sin embargo, su prevalencia es aún mayor en pacientes estériles al tratarse de una importante causa de infertilidad femenina, apareciendo con una incidencia hasta 7 y 10 veces superior a la de mujeres fértiles^{vi}.

En general, es difícil establecer con precisión esta prevalencia debido a la heterogeneidad de los diferentes trabajos publicados, incluyendo mujeres en situaciones etarias y hormonales diferentes, distintos criterios de inclusión, y variabilidad en los métodos y criterios diagnóstico-terapéuticos empleados.

Si nos ceñimos al diagnóstico en pacientes sintomáticas (es decir, no un diagnóstico puramente incidental), la prevalencia de la endometriosis se sitúa en un 45% de las pacientes que consultan por dolor pélvico, 35% cuando tienen quistes ováricos y en un 30% de pacientes que acuden a consulta por problemas de esterilidad^{vii}.

Factores de Riesgo

Se han descrito en la literatura una serie de factores de riesgo para padecer endometriosis. Algunos han sido definidos como causa y otros como consecuencia de padecer la enfermedad.

1. Edad

La endometriosis pélvica es rara antes de la menarquia y tiende a descender su incidencia hacia la menopausia.

Se ha situado la incidencia máxima de la enfermedad entre los 30 y los 50 años, con un pico a los 35 años, coincidiendo con la disminución de la capacidad reproductora. Esto puede explicarse por el hecho de que lesiones mínimas de endometriosis pueden evolucionar con el tiempo hacia lesiones clásicas fácilmente diagnosticables por ecografía y por laparoscopia.

2. Clase social y personalidad

En el pasado se postuló que mujeres de clase social alta y con una personalidad determinada (más inteligentes y con altas motivaciones) presentaban cierta predisposición a padecer la enfermedad^{viii}. Es evidente que este grupo tiene un mayor acceso a mejores servicios médicos y consecuentemente a una mejor investigación y diagnóstico de sus problemas.

3. Raza

Algo similar ocurre con la raza: parece que las mujeres de raza blanca tienen una incidencia mayor de endometriosis que las de raza negra, probablemente porque han sido más estudiadas. Hay estudios que muestran una incidencia del 10% en mujeres asiáticas, 6% en norteamericanas y europeas y 1% en africanas.

Sin embargo, los estudios no son comparables entre sí en cuanto a métodos diagnósticos o sensibilidad del cirujano para detectar las lesiones, por lo que no podemos concluir que existan evidencias científicas que apunten hacia una predisposición racial a padecer la enfermedad^{ix}.

4. Esterilidad

La prevalencia en mujeres fértiles se sitúa entre el 5 y el 25%, llegando a un 60% en pacientes con esterilidad de causa desconocida que son

sometidas a una laparoscopia diagnóstica ante la falta de otros diagnósticos que justifiquen su esterilidad^x, dando evidencia de lo habitual que es el infradiagnóstico en esta enfermedad.

ETIOPATOGENIA DE LA ENDOMETRIOSIS

Las diferentes observaciones respecto a la patogenia de la endometriosis se pueden resumir en 5 teorías, que a su vez se pueden incluir en dos grupos según si el origen de los implantes procede de endometrio uterino o extrauterino.

1) Origen de la endometriosis de endometrio uterino

1.1. *Teoría de la menstruación retrógrada*

Es la teoría más antigua y aceptada sobre la etiopatogenia de la endometriosis. Fue propuesta en 1920 por Sampson. Postula que la menstruación asciende a través de las trompas de Falopio y desemboca en la cavidad peritoneal, favoreciéndose la adhesión, invasión y el crecimiento de los fragmentos de endometrio depositados en dicha cavidad peritoneal^{iv}. Las células endometriales representan de esta manera un autotrasplante, en el que el tejido endometrial normal se transloca a una localización ectópica en el organismo.

Esta teoría se consolidó al encontrar un mayor volumen de sangre y tejido endometrial en la pelvis de las mujeres con endometriosis. En estas mujeres, también se ha observado hiperperistalsis y disperistalsis uterina, con mayor reflujo endometrial^{xi}.

Todo lo citado demuestra la mayor frecuencia de endometriosis pélvica y la distribución anatómica de las lesiones; sin embargo, esta teoría no es capaz de explicar la presencia de endometriosis fuera de la cavidad peritoneal, su aparición en la pubertad temprana, recién nacidos, en

mujeres afectadas por el síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser o en el varón^{xi}.

1.2. Teoría de la diseminación hematógica o linfática del tejido endometrial (Teoría de Halban)

También se ha demostrado que la endometriosis es producto de la diseminación linfática o vascular aberrante del tejido endometrial. Esta teoría se basa en la presencia de endometriosis en sitios raros como el cerebro, la pleura, el periné o la región inguinal^{xii}, así como en el conocimiento de un drenaje linfático del cuerpo uterino a los ovarios. Además, la tendencia del adenocarcinoma endometrial a diseminarse por vía linfática demuestra la facilidad con la que las células endometriales pueden ser transportadas por esta ruta.

La región retroperitoneal posee una circulación linfática abundante; de esta manera, cuando no se identifican implantes peritoneales sino únicamente lesiones retroperitoneales aisladas, se postula que la diseminación pueda ser linfática siguiendo los principios clásicos de diseminación tumoral en los que la diseminación por contigüidad presentaría lesiones peritoneales subyacentes, y la diseminación por vía hematógica sería más a distancia.

Sin embargo, aunque esta teoría sigue resultando atractiva, por sí sola no es capaz de resolver la capacidad intrínseca del tejido ectópico de adhesión y progresión a nivel local o invasión por contigüidad.

2) Origen de la endometriosis de endometrio extrauterino

2.1. La teoría de la metaplasia celómica (Teoría de Meyer)

Propone que ambos tejidos, el peritoneo y el endometrio parecen tener un precursor embriológico común que es el epitelio celómico, un epitelio pluripotencial que puede sufrir transformación metaplásica hasta

convertirse en un tejido idéntico al endometrio normal desde el punto de vista histológico. Tanto el ovario como el antecesor del endometrio, los conductos de Müller, derivan del endometrio celómico, de manera que la metaplasia explicaría la endometriosis ovárica. Además, esta teoría se ha expandido para incluir al peritoneo por el potencial proliferativo y de diferenciación que posee el mesotelio peritoneal.

La demostración experimental de esta teoría ha sido difícil. Los agentes causales de esta metaplasia son poco conocidos. Se proponen a las dioxinas como posible agente químico externo que actúa como disruptor endocrino.

Esta teoría podría explicar por qué, aunque la mayoría de las mujeres tienen algún grado de menstruación retrógrada, sólo un pequeño porcentaje tiene endometriosis, así como la presencia de la enfermedad en ausencia de la menstruación^{xiii}, como sucede en las mujeres premenárquicas y postmenopáusicas. Sin embargo, la ausencia de endometriosis en otros tejidos derivados del epitelio celómico habla en contra de esta teoría.

2.2. Teoría de las células madre endometriales.

La teoría de las células madre endometriales, afirma que las células madre mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cell*) presentes en la circulación sanguínea y procedentes de médula ósea o de la capa basal del endometrio, podrían diferenciarse en tejido endometrial en distintas localizaciones incluso a distancia^{xiv}. Esta teoría explicaría cómo mujeres sin útero, hombres con cáncer de próstata o tras tratamientos con dosis altas de estrógenos, pueden padecer endometriosis.

2.3. Teoría de los restos Müllerianos.

La teoría de la migración de los conductos de Müller propone que las células residuales en el recorrido durante el desarrollo embrionario

mantienen la capacidad de desarrollar lesiones endometriósicas al ser influenciadas por un estímulo estrogénico^{xv}. Hallazgos recientes han demostrado la presencia de endometrio ectópico en fetos femeninos a nivel del tabique rectovaginal, fondo de saco de Douglas, pared posterior o interior de la pared del útero, y a nivel de la muscularis del recto^{xv}.

ESTABLECIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

Aunque la menstruación retrógrada, o cualquiera de las teorías anteriormente mencionadas, explica la aparición de células endometriales en la cavidad peritoneal o en otras localizaciones, son necesarios pasos adicionales para el desarrollo de los implantes de endometriosis, como pueden ser:

- Evitar su eliminación por parte del sistema inmunitario.
- Que estos implantes se adhieran al epitelio y lo invadan.
- El desarrollo por parte de los implantes celulares de neovascularización a nivel local, así como continuar con su crecimiento y sobrevivir.

Para que todo este procedimiento pueda ocurrir deberán intervenir, por tanto, múltiples mecanismos genéticos, biológicos e inmunológicos, pudiendo de esta manera establecerse la enfermedad.

Predisposición genética

La endometriosis posee un componente hereditario relevante, siendo significativamente más común en familiares de primer grado de mujeres con la enfermedad. Un estudio llevado a cabo sobre gemelos monocigóticos demostró que la endometriosis se diagnosticó de forma concurrente en 14 de las 16 parejas de gemelos integrantes en él^{xvi}.

Esta naturaleza hereditaria de la endometriosis ha llevado a muchos grupos a investigar qué gen o conjunto de genes pueden ser responsables de la enfermedad.

Se han identificado muchos genes disregulados en las células endometriósicas implicados en una amplia variedad de funciones que incluyen la apoptosis, la regulación del ciclo celular, vascularización, regulación del sistema inmunitario y la adhesión celular^{xvii}, como por ejemplo la sobreexpresión del gen antiapoptótico Bcl-2^{xviii}. Sin embargo, debido a la metodología y variabilidad de los estudios implicados, las regiones cromosómicas identificadas son grandes y contienen muchos genes de potencial interés, requiriéndose más estudios para poder dilucidar las variantes de susceptibilidad de padecer endometriosis.

Un estudio multicéntrico realizado entre hospitales de Inglaterra y Australia asoció de forma estadísticamente significativa la expresión de la región cromosómica 10q26 con la endometriosis^{xix}, y estudios más recientes han demostrado que la región 7p15.2 está igualmente implicada^{xx}. Desafortunadamente, la identificación de los genes exactos responsables del componente hereditario de la endometriosis no se ha conseguido hasta la fecha. Además de los estudios en humanos, también se ha demostrado la agregación familiar de endometriosis en primates como el macaco rhesus o el babuino^{xxi}.

La expresión de las regiones cromosómicas citadas son características heredadas que van a favorecer la supervivencia de la célula endometriósica. Sin embargo, la endometriosis es una enfermedad compleja en la que están implicados de manera muy significativa tanto un componente genético como un componente ambiental. En los últimos años se está comprobando la relevancia que tiene la epigenética en esta enfermedad, habiéndose demostrado que los receptores de estrógenos y progesterona se encuentran hipometilados en el endometrio ectópico,

explicando una mayor expresión de estrógenos y, por tanto, obteniéndose un mayor efecto estrogénico a nivel local^{xxii}.

Dependencia hormonal

Los estrógenos parecen tener una relación causal con la endometriosis. La mayor parte de los estrógenos en la mujer son producidos directamente en los ovarios, pero se sabe que otros tejidos periféricos también sintetizan estrógenos por medio de la aromatización de los andrógenos ováricos y suprarrenales. Los implantes endometriósicos expresan aromatasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1, que son las enzimas encargadas de convertir la androstenediona en estrona y la estrona en estradiol. Al mismo tiempo, en estos implantes endometriósicos existe un déficit de 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, enzima encargada de desactivar a los estrógenos (pasa el estradiol a estrona) y se expresan de forma diferente los receptores estrogénicos α y β , con un marcado aumento de los receptores β , favoreciendo todo ello un mayor ambiente estrogénico. De esta forma, los estrógenos locales producidos en las lesiones endometriósicas ejercen su efecto biológico dentro del mismo tejido o en las células en las que son producidos, fenómeno llamado *intracrinología*.

Resistencia a progesterona

El tejido endometrial normal o endometrio eutópico no expresa aromatasa y produce abundante deshidrogenasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 en respuesta a la progesterona, asegurando la atenuación de los efectos estrogénicos a nivel endometrial durante la fase lútea. Sin embargo, a diferencia del endometrio eutópico, en la endometriosis hay una resistencia relativa a la progesterona que impide esta atenuación del estímulo estrogénico^{xxiii}.

La prostaglandina E2, es el inductor más potente de la actividad de la aromatasa en las células del estroma endometrial y actúa a través del receptor de PGE2. El estradiol producido por la mayor actividad de la aromatasa aumenta a su vez la producción de PGE2 al estímulo de la ciclooxigenasa 2 en las células endometriales del útero, originando una retroalimentación positiva que acentúa los efectos estrogénicos sobre los implantes endometriósicos^{xxiv}.

Factores inmunológicos

Partiendo de la base de que en la mayoría de mujeres se produce menstruación retrógrada, ese tejido ectópico va a ser eliminado de la cavidad peritoneal por células del sistema inmunitario: macrófagos, células *natural killer* (NK) y linfocitos. De esta manera, el porcentaje de pacientes con menstruación retrógrada que va a desarrollar una endometriosis es relativamente bajo^{xxv}. Diferentes estudios han mostrado la posibilidad de que alteraciones en el sistema inmunitario sean las responsables de la persistencia del endometrio ectópico.

Dentro de las células que forman parte de la inmunidad innata se encuentran los macrófagos, los cuales actúan como fagocitos en diversos tejidos y se ha observado un mayor número en la cavidad peritoneal de las pacientes con endometriosis. En condiciones normales, los macrófagos participan en el reconocimiento de células extrañas y dañadas en la cavidad peritoneal y, una vez reconocidas, estas células son procesadas por ellos para presentarlas a los linfocitos T. Sin embargo, en pacientes con endometriosis, se ha demostrado un mal funcionamiento de los macrófagos peritoneales, los cuales inducen la génesis de factores de crecimiento y citoquinas que pueden promover la supervivencia de las células endometriales ectópicas, favoreciendo el establecimiento de la enfermedad^{xxvi}.

En el estudio realizado por Braun en 1994^{xxvii}, los monocitos circulantes tomados de mujeres con endometriosis aumentaron la proliferación *in vitro* de las células endometriales en cultivo, mientras que los monocitos provenientes de mujeres sin endometriosis mostraron el efecto opuesto. Por consiguiente, la función alterada de los macrófagos, y no el tamaño de su población, parece estar implicada en la proliferación del tejido endometriósico.

De manera similar, una alteración de la producción de citoquinas por parte de los linfocitos T, puede inducir cambios en la consistencia del líquido peritoneal, lo que permite un entorno favorable para la proliferación ectópica de tejido endometrial^{xxvi}.

Otra célula inmunitaria relacionada con la endometriosis son los linfocitos NK, células que poseen la capacidad de reconocer células infectadas por virus, células tumorales o células alteradas por algún tipo de estrés que induce cambios en su fenotipo, ejerciendo una actividad citotóxica contra ellas. El número de linfocitos citotóxicos no se modifica en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis, pero se ha demostrado que son menos citotóxicos contra el tejido endometrial^{xxviii}. Específicamente se ha observado que el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis está provisto de quimioquinas y citoquinas que son capaces de suprimir la actividad de los linfocitos NK^{xxix}.

Otro mecanismo relacionado con la tolerancia del sistema inmunitario a los focos de endometriosis es la molécula HLA-G, un antígeno principal de histocompatibilidad no clásico o de clase Ib (MHC Ib) que interviene en distintos mecanismos de tolerancia, fundamentalmente durante el embarazo. Este antígeno, expresado por el trofoblasto fetal, se uniría a los receptores inhibidores de las células NK de la decidua materna, evitando que estas células ataquen al trofoblasto. También, es expresado por células tumorales, induciendo una inhibición de la respuesta

inmunitaria y facilitando el escape tumoral^{xxx}. Este antígeno es especialmente expresado en los focos de endometriosis, lo que bloquearía una posible actividad de las NK para eliminar esos focos^{xxxi}.

Otros estudios han demostrado una alteración en la inmunidad humoral en las pacientes con endometriosis. Se ha observado un aumento en la concentración de anticuerpos IgG frente a antígenos endometriales, así como anticuerpos IgG e IgA contra tejido endometrial y ovárico^{xxxii}. Esto puede ser explicado porque el sistema inmunitario de una mujer no está expuesto en condiciones normales a niveles elevados de antígenos endometriales. La presencia de cantidades aumentadas de proteínas endometriales en localizaciones extrauterinas en pacientes con endometriosis puede provocar respuestas autoinmunes humorales o mediadas por células.

Por otro lado, las mujeres con endometriosis presentan una mayor concentración en sangre de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8. De hecho, para distinguir entre las mujeres con y sin endometriosis se puede utilizar la concentración sérica de IL-6 y la concentración en líquido peritoneal de TNF- α , que será superior en pacientes con endometriosis con respecto a pacientes sanas^{xxxiii}.

Otras citoquinas como la proteína quimiotáctica 1 de monocitos (MCP-1/CCL2) y RANTES (CCL5) atraen a los monocitos. La concentración de estas quimioquinas en el líquido peritoneal se ha visto aumentada en mujeres con endometriosis y es directamente proporcional a la severidad de los síntomas de la enfermedad^{xxxiv}. Así mismo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un agente angiogénico, que aumenta con el estradiol en las células del estroma endometrial y en el líquido peritoneal, hallándose también en concentraciones más altas en pacientes con endometriosis, lo cual probablemente guarde relación con la implantación y perpetuación de la enfermedad.

Esta situación de activación inmunitaria local ha determinado que algunos autores consideren la endometriosis como una enfermedad autoinmune^{xxxv}.

ASPECTOS CLÍNICOS Y TERAPÉUTICOS DE LA ENDOMETRIOSIS

Anatomía patológica

- Características macroscópicas: la endometriosis presenta un aspecto macroscópico de un líquido de densidad media y color achocolatado, secundario a los depósitos de hemosiderina producido por las células endometriales allí presentes.

Hablaríamos de *lesiones típicas* en los casos en los que hallamos “quistes de chocolate” o endometriomas, comúnmente en los ovarios; y *lesiones atípicas* cuando son secundarias a la fibrosis consecuente a la inflamación que generan. Estas lesiones atípicas se manifiestan como lesiones rojas o en llama, zonas de peritoneo petequial y áreas de hipervascularización que afectan principalmente al peritoneo, el ligamento ancho y a los ligamentos úterosacros.

- Características microscópicas: se definen por la presencia glándulas endometriales y estroma, siendo necesaria la presencia de ambas para poder establecer el diagnóstico histológico de endometriosis. Como consecuencia del componente inflamatorio se suelen hallar fibroblastos y los ya citados productos de degradación de la sangre como la hemosiderina.


Clasificación

La endometriosis se clasifica atendiendo a distintos criterios. La clasificación más usada es la establecida por la Sociedad Americana de Fertilidad (ASRM, *American Society for Reproductive Medicine*), que establece 4 estadios de gravedad según el tamaño y localización de las lesiones, así como la presencia o no de adherencias y sus características en caso de que las hubiera^{xxxvi}.

Esta clasificación ha sido muy cuestionada dado que no tiene en cuenta la actividad biológica de los implantes endometriósicos, lo cual se considera más importante que la localización e incluso que la extensión de la enfermedad, habiendo pacientes que con focos mínimos de endometriosis presentan una gran actividad y consecuentemente una gran repercusión clínica, mientras que, por el otro lado encontramos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad según la clasificación ASRM que se hayan silentes desde el punto de vista clínico.

Por otra parte, la clasificación de la ASRM no describe en detalle la extensión de una posible endometriosis profunda, responsable en la mayoría de casos de la clínica de dolor de la paciente. En este sentido, en 2012 se publicó la clasificación de ENZIAN^{xxxvii}, una clasificación más sencilla, reproducible, posible de hacer mediante métodos diagnósticos habituales sin necesidad de cirugía, y que se centra en detalle en la endometriosis profunda, la cual se correlaciona mucho más con la repercusión clínica de la endometriosis.

A continuación, se adjuntan ambas clasificaciones en su versión original:



AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

Patient's Name _____ Date _____

Stage I (Minimal) - 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____

Stage II (Mild) - 6-15 Recommended Treatment _____

Stage III (Moderate) - 16-40

Stage IV (Severe) - > 40

Total _____ Prognosis _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm
	Superficial	1	2	4
Deep	2	4	6	
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial	Complete	
		4	40	
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	TUBE	R Filmy	1	2
Dense		4*	8*	16
L Filmy		1	2	4
Dense		4*	8*	16

Figura 1. Clasificación de la endometriosis según la ASRM (1997)

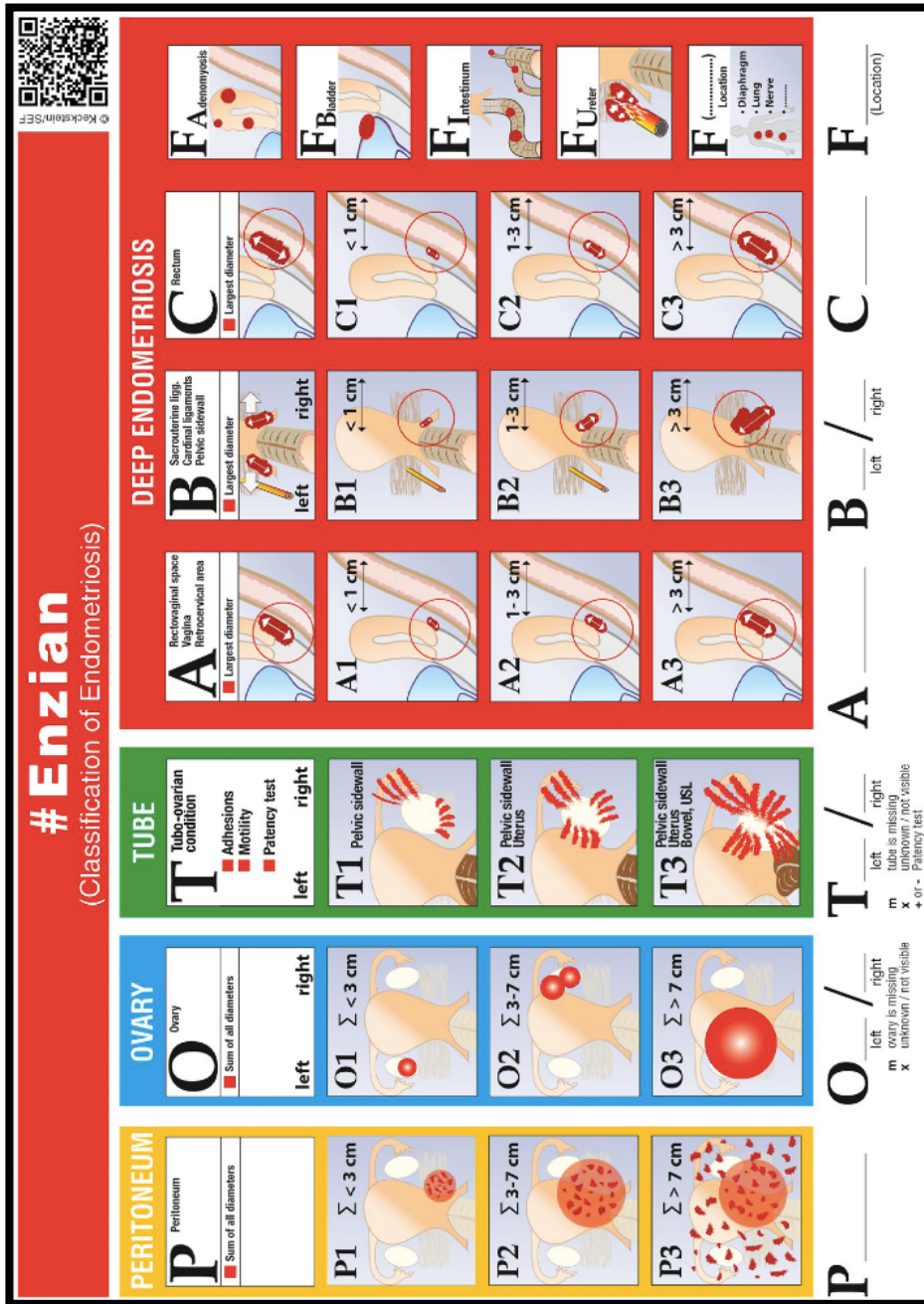


Figura 2. Clasificación de la endometriosis de ENZIAN (2012)

Clínica de la endometriosis

Establecer el diagnóstico de endometriosis basándose exclusivamente en los síntomas puede ser difícil, dado que su forma de presentación es muy variable y hay una considerable superposición de síntomas con otras causas de dolor pélvico, tales como la enfermedad pélvica inflamatoria o el colon irritable entre otras. Como resultado, con frecuencia hay una demora de varios años entre el comienzo de los síntomas y el diagnóstico definitivo de la enfermedad, que en determinadas pacientes puede llegar a generar un problema incapacitante con consecuencias directas sobre su personalidad y sus relaciones laborales y familiares.

Los síntomas clásicos de la endometriosis son la dismenorrea o dolor menstrual, la dispareunia o dolor con las relaciones sexuales, el dolor pélvico crónico y en ocasiones la disquecia o dolor con la defecación y la disuria o dolor con la diuresis.

Como signos clínicos estas pacientes pueden presentar: un aumento de la sensibilidad pélvica, presencia de un útero fijo en una posición de retroversión, ligamentos úterosacos dolorosos al tacto u ovarios aumentados de tamaño en el examen físico.

En casos severos de endometriosis profunda, puede llegar a haber afectación de la pared rectal o de las vías urinarias que, en última instancia, provoquen complicaciones severas tales como una obstrucción intestinal o distintos grados de hidronefrosis que pueden desembocar en la anulación de la función renal por compresión extrínseca.

Por último, es ampliamente aceptado que la endometriosis provoca efectos negativos sobre la fertilidad de la mujer. Sin embargo, el mecanismo por el cual se asocia a la infertilidad sigue sin conocerse correctamente. Son varios los mecanismos que han sido propuestos al respecto, incluyendo la distorsión de la anatomía pélvica, la alteración de

la función ovárica, disminución de la reserva folicular, la afectación de la receptividad endometrial, y la reducción de la calidad tanto de los ovocitos como de los embriones. Además, afecta al éxito de las técnicas de reproducción asistida, al reducir la respuesta ovárica a la estimulación de la ovulación^{xxxviii}.

Diagnóstico de la endometriosis

El retraso diagnóstico de la endometriosis es sello distintivo de una enfermedad que a veces puede tener consecuencias invalidantes y un importante impacto en la vida de las personas que sufren sus síntomas. Son múltiples los estudios que han demostrado un lapso significativo de tiempo entre el inicio de los primeros síntomas y el momento en el que se establece un diagnóstico^{xxxix}. Estos estudios se basan en casos en los que el diagnóstico se establece mediante confirmación quirúrgica con estudio histológico^{xi}, considerada hasta hace poco el *gold standard*.

Sin embargo, los avances en la calidad y disponibilidad de las técnicas de imagen por un lado, y el riesgo quirúrgico, acceso limitado a cirujanos altamente cualificados e implicaciones financieras por el otro, requiere la necesidad urgente de una reconsideración de este dogma tal vez obsoleto.

El diagnóstico de la endometriosis^{xii} se puede esquematizar en tres partes: sospecha clínica y exploración, técnicas de imagen y diagnóstico quirúrgico e histológico.

Diagnóstico clínico

Como acabamos de citar, cualquier paciente en edad fértil con dolor menstrual u otro tipo de dolor pélvico crónico, en especial si es asociado a la regla, ha de ser valorada como una potencial paciente con endometriosis. Establecida esa idea, la historia clínica y la exploración

física han de ir encaminadas a descartarla o a buscar indicios que reafirmen nuestra hipótesis.

La historia clínica ha de incluir un estudio de antecedentes familiares y personales, así como un análisis exhaustivo de los síntomas: su inicio, duración, intensidad y su respuesta a tratamiento.

Clásicamente los síntomas que se han relacionado con la presencia de endometriosis han sido la dismenorrea, el dolor pélvico crónico (definido como la presencia de un dolor no cíclico de 6 o más meses de duración localizado anatómicamente en la pelvis y lo suficientemente severo como para provocar alteraciones funcionales que requieren tratamiento médico o quirúrgico), la dispareunia, la sintomatología digestiva como la disquecia, y la sintomatología urológica como la disuria^{xlii}. El dolor, sobre todo el pélvico crónico, es característicamente palpitante, sordo o agudo, se exagera con la actividad física y empeora con el paso del tiempo. Además, en algunos estudios se ha demostrado una asociación con la fatiga crónica, bajo nivel de energía y febrícula, lo que sugiere un componente neuropático^{xliii}.

Lamentablemente, estos síntomas son comunes a otras patologías y, por el contrario, hay endometriosis que cursan de manera paucisintomática. Esto, probablemente contribuya de manera significativa al importante retraso diagnóstico de la enfermedad.

Es importante destacar en el apartado de la historia clínica que en pacientes con síntomas de disquecia, disuria y/o rectorragia, especialmente catameniales, hay que sospechar una endometriosis infiltrante profunda potencialmente grave, y en estos casos el estudio a realizar ha de ir orientado a confirmar esta sospecha, debiendo para ello ser estudiada la paciente en una unidad especializada. La capacidad predictiva de la sintomatología en el diagnóstico de la endometriosis

alcanza cotas de sensibilidad del 82% en pacientes con estos estadios avanzados de la enfermedad^{xliv}.

Con respecto a la exploración física siempre debe documentarse una valoración vaginal y cervical mediante especuloscopia, un tacto vaginal bimanual y un tacto rectal.

Técnicas de imagen

La ecografía transvaginal en manos expertas alcanza tasas de sensibilidad y especificidad muy similares e incluso superiores en algunas localizaciones a la resonancia magnética, que en general se considera la técnica de imagen de elección para valoración de localizaciones profundas de la endometriosis, aunque con un coste mucho más elevado y, por tanto, menor disponibilidad.

Diagnóstico quirúrgico

El diagnóstico quirúrgico mediante laparoscopia debería quedar reservado para aquellas pacientes en las que, a pesar del tratamiento médico y un protocolo diagnóstico adecuado, no se ha llegado a establecer un diagnóstico claro ni a obtener una mejoría sustancial de los síntomas.

Tratamiento de la endometriosis

El tratamiento médico hormonal de la endometriosis se basa en su etiopatogenia: se asume que el tejido endometrial ectópico se comporta de forma similar al endometrio eutópico. Es por ello que los tratamientos médicos en general van encaminados a reducir o inhibir menstruaciones, reduciendo así la posible menstruación retrógrada; y a lograr la decidualización o diferenciación y posterior apoptosis de las células endometriales tras la exposición mantenida a estos tratamientos hormonales, fundamentalmente la progesterona.

Ante una paciente con sospecha clínica de endometriosis se recomienda iniciar tratamiento médico para evitar la progresión de la enfermedad, salvo en aquellos casos en los que la paciente vaya a iniciar próximamente la búsqueda de gestación^{vi}.

A continuación, se adjunta un cuadro resumen de las modalidades de tratamiento médico más empleadas y su mecanismo de acción.

CLASE	MECANISMO DE ACCIÓN	TIPO DE FARMACO
Estrógenos-gestágenos combinados, en pauta continua	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibir la ovulación • Decidualización-apoptosis de las lesiones 	<ul style="list-style-type: none"> • Píldora combinada • Anillo vaginal • Parche
Gestágenos	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibir la ovulación • Decidualización-apoptosis de las lesiones • Supresión del crecimiento e implantación de endometriosis facilitado por metaloproteasas 	<ul style="list-style-type: none"> • Minipíldora • Dienogest • Implante subdérmico • DIU (dispositivo intrauterino) de levonorgestrel • Gestágenos inyectables
Agonistas de GnRH	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de secreción de gonadotropinas y consecuente reducción de esteroidogénesis ovárica 	<ul style="list-style-type: none"> • Leuprolide depot inyectable intramuscular • Nafarelina intranasal
Esteroides androgénicos	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de secreción de gonadotropinas • Inhibición local de crecimiento celular • Inhibición de enzimas pro-estrogénicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Danazol

Tabla 1. Fármacos más usados para el tratamiento de la endometriosis

Sin embargo, la realidad es que en muchas ocasiones es muy complicado conseguir un tratamiento que sea efectivo para las pacientes con endometriosis por distintos motivos:

- Los métodos hormonales, especialmente aquellos que emplean estrógenos, presentan una cantidad no despreciable de

contraindicaciones. Por ejemplo, no pueden ser empleados en pacientes con más de 35 años y fumadoras, o en pacientes con migrañas con aura, patologías y circunstancias con una alta prevalencia en nuestra población^{xlv}.

- Los efectos secundarios^{xlvi}, aunque menores, son habituales y son causa frecuente de cese del uso de los mismos.
- Los tratamientos hormonales en general tienen mala receptividad por parte de las pacientes, habitualmente por falta de información de calidad, y es difícil conseguir una buena adherencia al tratamiento^{xlvii}.

Es por todo ello que, el estudio en profundidad del origen de la patología se plantea como la principal baza para obtener tratamientos eficaces, bien tolerados y con menos contraindicaciones que los existentes en la actualidad.

Cirugía de la endometriosis

Una de las características de la endometriosis es que puede alterar drásticamente la arquitectura anatómica de la pelvis y, por ello, es difícil establecer protocolos normalizados de abordaje quirúrgico de la enfermedad.

El tratamiento quirúrgico de la endometriosis, en términos generales, estaría indicado en los siguientes supuestos:

- Sospecha de malignidad.
- Fracaso de terapia médica.
- Se puede plantear en pacientes con esterilidad de causa desconocida con todo el estudio de fertilidad normal en ambos cónyuges.

En cuanto a la cirugía como tal, las intervenciones quirúrgicas para el abordaje de la endometriosis se suelen caracterizar por la necesidad de la cierta “improvisación” en función de los hallazgos que, en muchas

ocasiones, al alterar la anatomía normal, precisan de un conocimiento profundo del territorio pélvico, llegando en muchos casos a ser preciso realizar abordajes propios de la cirugía oncológica.

La cirugía puede ser conservadora, cuando se lleva a cabo la exéresis de los quistes e implantes endometriósicos con la intención de preservar el útero y la mayor cantidad posible de tejido ovárico^{xlviii}; y radical, cuando se procede a la extirpación de útero y ovarios asociado a los implantes endometriósicos que hubiera.

Cirugía conservadora

La cirugía conservadora es la opción de primera línea para la mayoría de las mujeres que planifican un tratamiento quirúrgico de endometriosis puesto que preserva la fertilidad y la actividad hormonal, es menos invasiva y conlleva una menor morbilidad que la cirugía definitiva, habiendo demostrado además su eficacia a corto plazo.

La revisión Cochrane de 2014 y un metanálisis de 10 ensayos sobre cirugía laparoscópica de endometriosis informaron que la cirugía laparoscópica conservadora redujo el dolor general (73 versus 21%) y aumentó las tasas de nacidos vivos o de embarazo clínico (30 versus 18%) en comparación con la laparoscopia diagnóstica^{xlix}.

La desventaja de la cirugía conservadora es que la tasa de recurrencia de los síntomas es mayor, en comparación con la cirugía definitiva. La tasa de reintervención parece aumentar con el tiempo para la cirugía conservadora, mientras que permanece relativamente estable para la cirugía definitiva^l.

La cirugía conservadora también es conocida como *toilette* de endometriosis y puede incluir uno o varios de los siguientes procedimientos:

- Quistectomía o exéresis del endometrioma ovárico (Figuras 3 y 4). La intervención quirúrgica debe incluir la extirpación completa de la cápsula del endometrioma para minimizar el riesgo de posteriores recidivas. Como se resume en la revisión Cochrane de 2008ⁱⁱ, que incluyó dos ensayos clínicos aleatorizados, la quistectomía se asocia con una tasa reducida de recurrencia del endometrioma y de los síntomas, así como de un aumento de las tasas de embarazo espontáneo en comparación con la cirugía ablativa. También presenta menos recurrencias que el tratamiento con láser CO₂ⁱⁱⁱ.

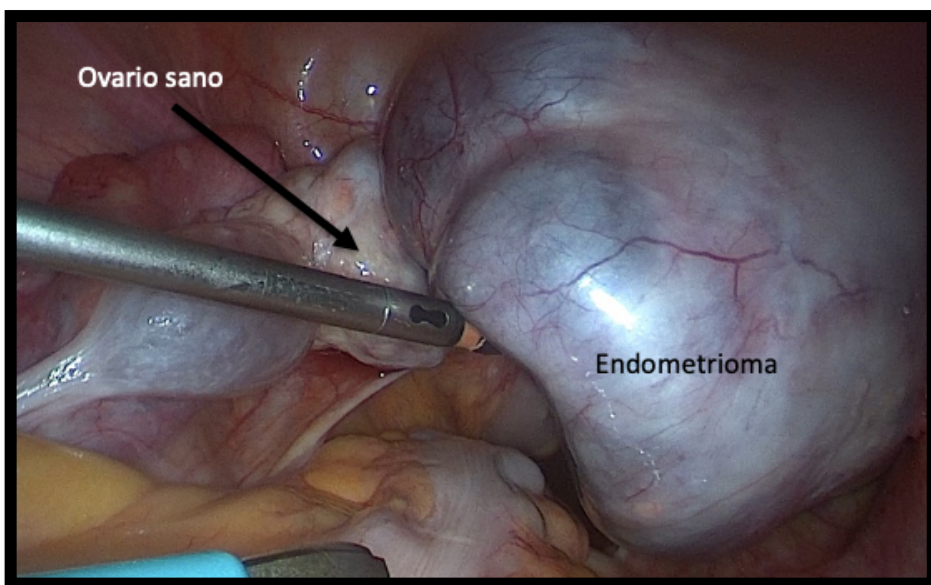


Figura 3. Imagen de un endometrioma ovárico izquierdo gigante en una cirugía laparoscópica

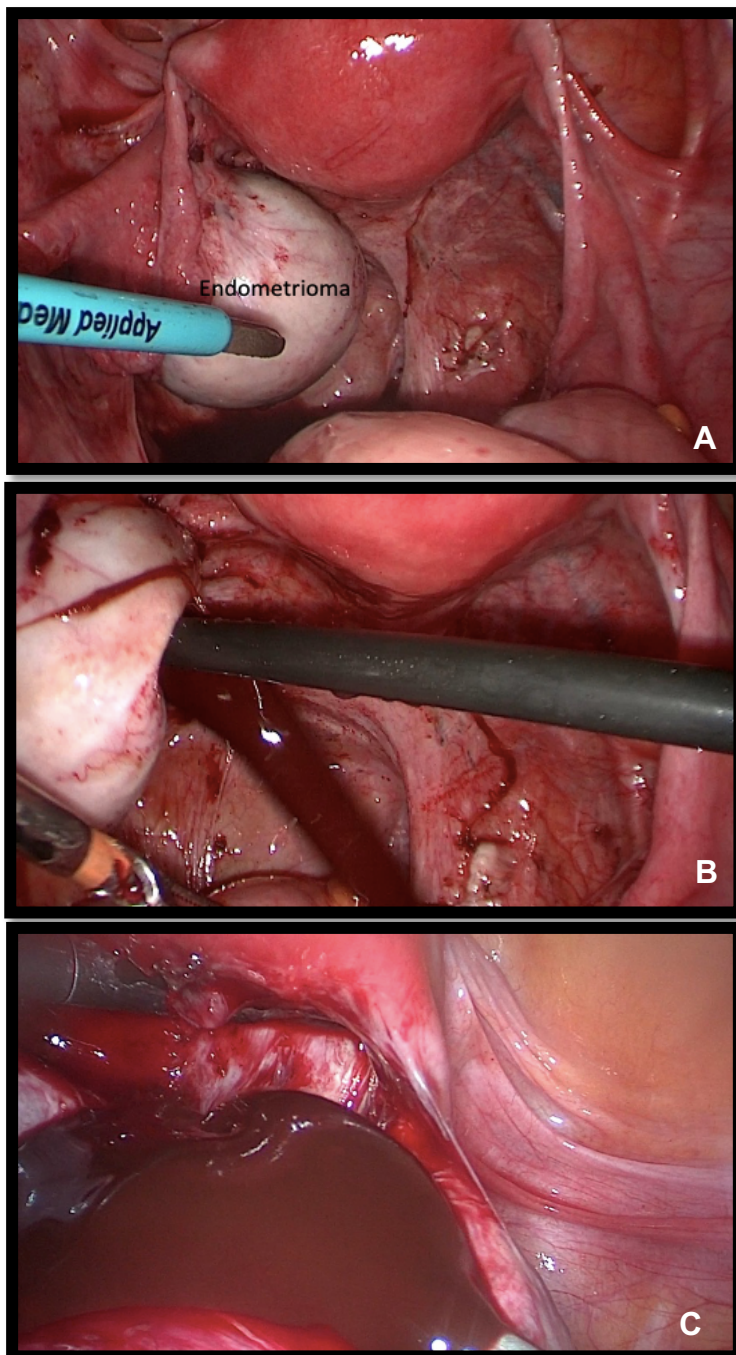


Figura 4. Imágenes de un endometrioma ovárico durante una cirugía laparoscópica en la misma paciente. A) Endometrioma del ovario izquierdo de 4cm íntegro. B) Endometrioma durante su drenaje previo a una quistectomía. C) Detalle del contenido del endometrioma con la clásica coloración y consistencia achocolatada.

- Nódulos rectales o rectovaginales (Figura 5). Existe controversia sobre la técnica más apropiada para la exéresis de este tipo de nódulos que suelen afectar, habitualmente, a la cara anterior del recto con diferentes tipos de infiltración.

Mientras que algunos autores abogan por la resección de la zona rectal afectada con anastomosis término-terminal del recto, otros defienden la técnica denominada *shaving* o afeitado que consiste en la exéresis cuidadosa, sin resección intestinal, del nódulo que infiltra el recto. La recurrencia en casos de “afeitado” en la superficie rectal oscila entre el 10.4 y el 22.2%^{liii}, mientras que en el caso de la resección segmentaria intestinal disminuye hasta el 2.19, aunque con una morbilidad mucho más alta^{liv}.

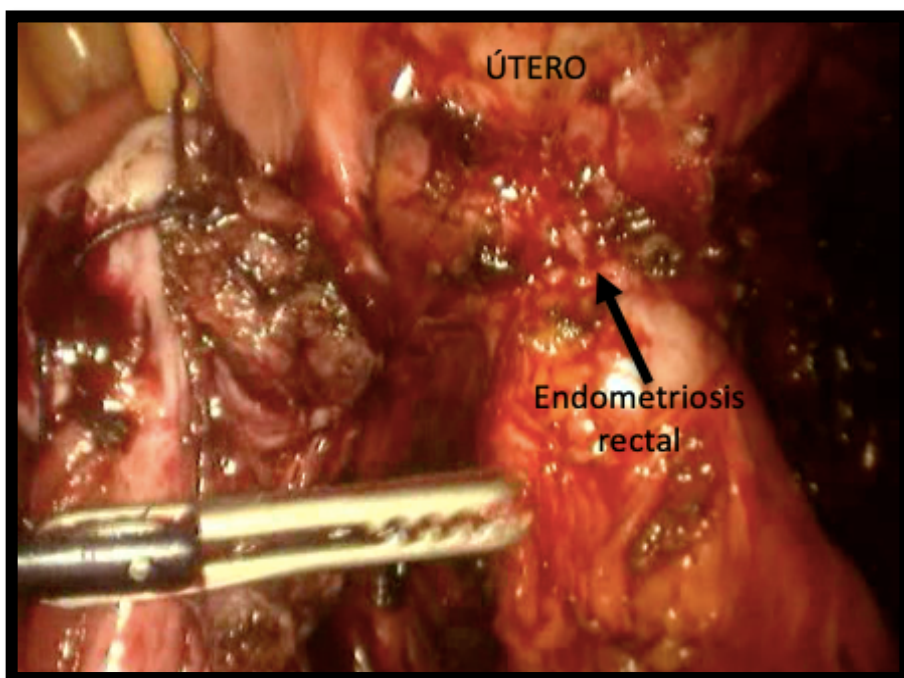


Figura 5. Imagen de un nódulo endometriósico. Implica a la pared rectal anterior y a la pared uterina posterior provocando una adherencia densa entre ambos órganos.

Podemos concluir que en todos los casos existen buenos resultados con una baja tasa de recurrencias independientemente de la técnica quirúrgica empleada, por lo que habrá que individualizar cada caso.

- Endometriosis vesical. Se define como la endometriosis que afecta a todo el espesor del músculo detrusor de la vejiga (Figura 6).

El tratamiento quirúrgico puede realizarse mediante abordaje laparoscópico y debe incluir la resección total de los nódulos endometriósicos vesicales (Figura 7), con una tasa de recurrencias tras cirugía completa de menos del 1%^{IV}.

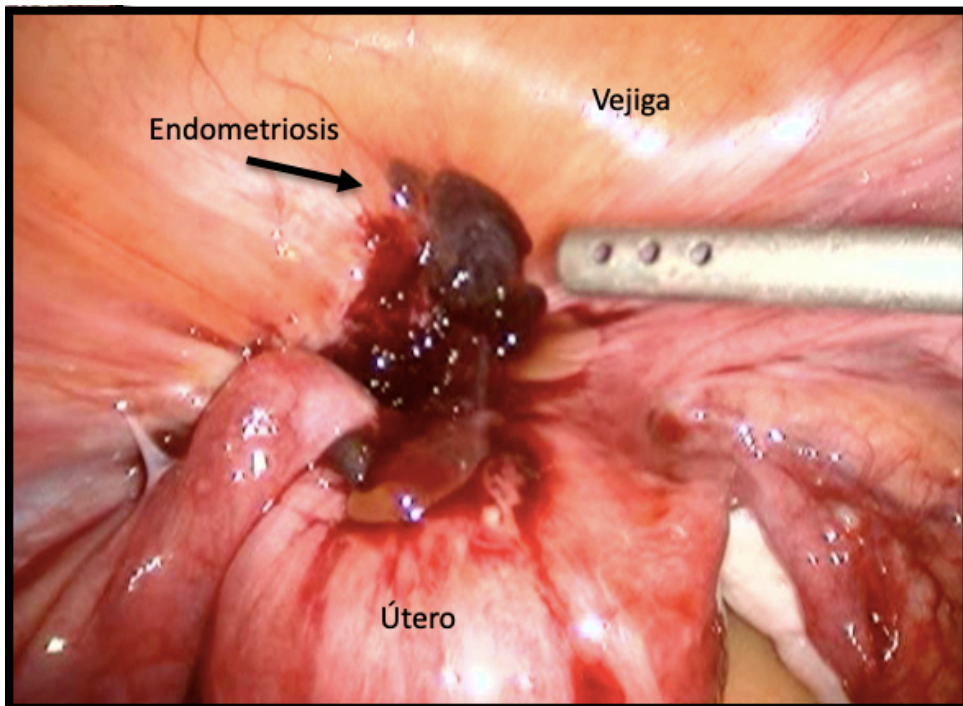


Figura 6. Gran nódulo endometriósico. Se origina en la pared uterina e infiltra ampliamente la pared vesical

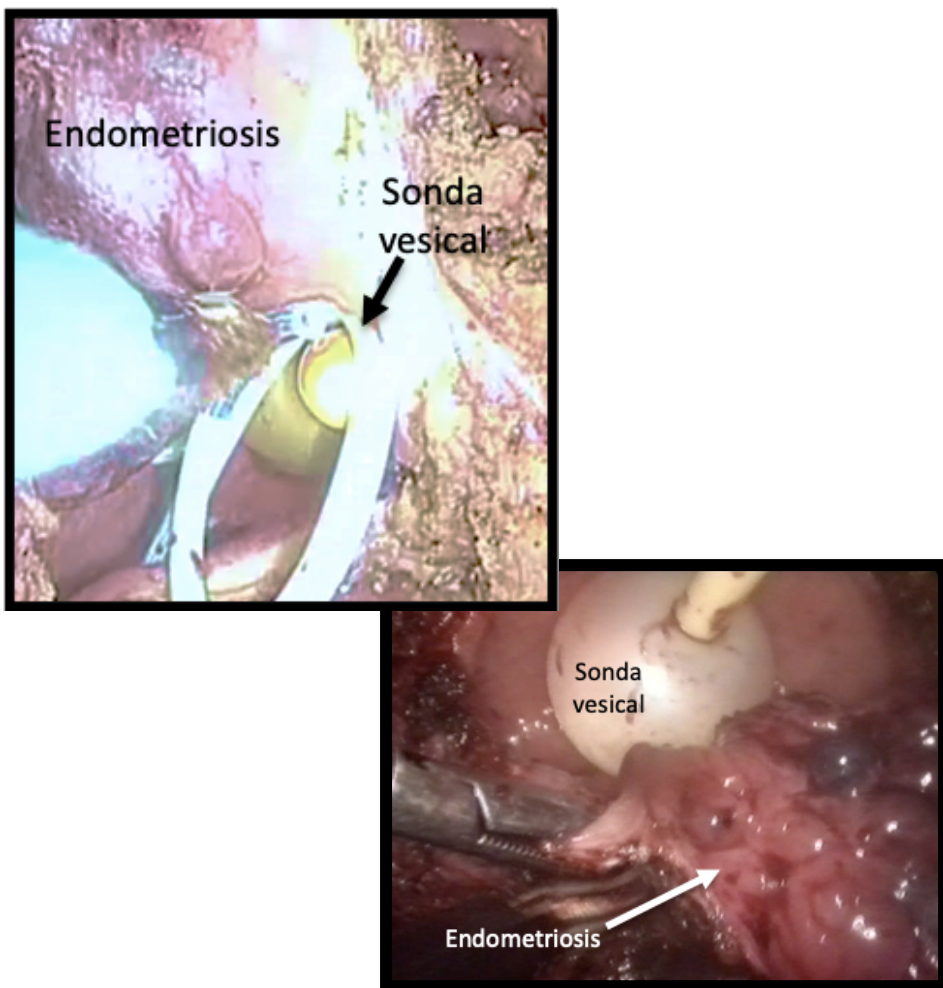


Figura 7. Imágenes de cirugías laparoscópicas sobre diferentes pacientes con endometriosis vesical durante la cistectomía parcial. Se aprecia en ambos casos el nódulo endometriósico y la sonda vesical tras la apertura amplia de la vejiga.

- Endometriosis peritoneal (Figura 8). Se diagnostica generalmente en el acto quirúrgico puesto que su visualización con técnicas de imagen es muy compleja. Se recomienda la destrucción completa de las lesiones mediante escisión quirúrgica ya que, otras técnicas como la fulguración o la ablación láser, no garantizan la extirpación completa y no permiten un estudio histológico posterior ^{lv}.

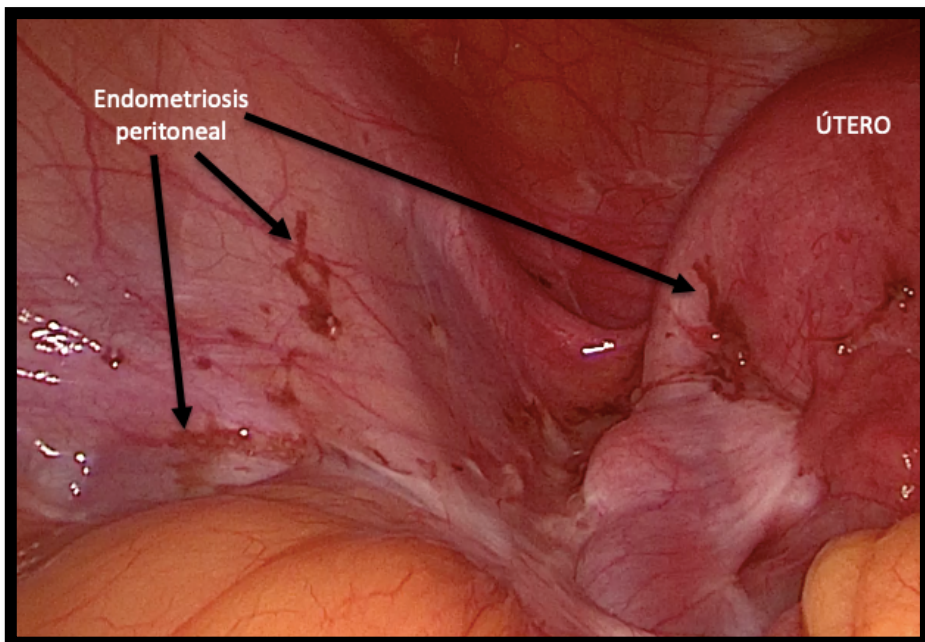


Figura 8. Múltiples lesiones superficiales peritoneales de endometriosis detectadas durante una cirugía laparoscópica

Cirugía radical o definitiva

Se ofrece a mujeres con síntomas incapacitantes presumiblemente a causa de la endometriosis, que han completado sus deseos genésicos y/o en las que ya han fallado otras opciones de tratamiento, incluyendo cirugías conservadoras previas. Las principales desventajas de la cirugía definitiva son la mayor morbilidad quirúrgica, la pérdida de fertilidad y los síntomas derivados de la menopausia quirúrgica.

Fedele y col. (2005)^{vii} acuñaron el término histerectomía radical modificada para describir una histerectomía adaptada a los hallazgos anatómicos específicos de la endometriosis, al extraer nódulos infiltrantes del tabique rectovaginal y/o vesicovaginal. Esta cirugía incluyó la histerectomía, anexectomía bilateral, todas las lesiones endometriósicas y un tercio superior de la vagina en los casos de lesiones del epitelio vaginal lateral y/o posterior. Sobre una cohorte de 38 pacientes con

endometriosis intervenida al menos una vez y resistente a tratamientos hormonales, se compararon aquellas sobre las que posteriormente se realizó una histerectomía clásica con doble anexectomía (26) con otras sobre las que se practicó la histerectomía radical (12). No hubo recurrencia de los síntomas tras 18 meses de la cirugía radical, en comparación con el 30% de recurrencia de la histerectomía estándar.

La ooforectomía aumenta la eficacia de la cirugía definitiva en cuanto a reducción sintomática y menor tasa de recurrencia, pero también se acompaña de los problemas derivados de la menopausia quirúrgica precoz. No hay datos que establezcan un límite basado en la edad para la ooforectomía. En nuestra práctica, informamos a todas las mujeres que se someten a una cirugía definitiva sobre los riesgos y beneficios de la ooforectomía, y tendemos a evitar la ooforectomía en pacientes menores de 40 años.

En conclusión, existe un debate continuo sobre la técnica quirúrgica más adecuada a emplear. El objetivo final de la cirugía es combinar una alta efectividad en términos de alivio de los síntomas, tasa de recurrencia y riesgo de complicaciones. Sin embargo, estos requisitos tienden a ir en direcciones opuestas siendo las intervenciones más agresivas las más efectivas pero también las que más riesgos implican, mientras que lo contrario es válido para enfoques menos agresivos. El principal factor de recurrencia de la endometriosis es la cirugía incompleta, por lo que, a mayor radicalidad de la cirugía, mejores resultados en cuanto a resolución definitiva de los síntomas, a expensas de la mayor radicalidad, lo cual lleva a que, en muchas ocasiones, la decisión del tipo de cirugía a indicar sea compleja.

ENDOMETRIOSIS Y APOPTOSIS

El mecanismo fisiológico de muerte celular programada, que recibe el nombre de apoptosis, está implicado en la regulación del número de células en los tejidos, en la atrofia de ciertos órganos durante el desarrollo embrionario normal y en la remodelación de tejidos^{lviii}. Es un proceso controlado genéticamente donde la propia célula, en respuesta a diferentes estímulos, induce su propia muerte. Se caracteriza por un conjunto de cambios a nivel bioquímico y morfológico como la reducción del volumen celular y nuclear, seguido de la condensación de la cromatina y del citoplasma formando agregados. Todo va acompañado por cambios en el citoesqueleto y retículo endoplasmático formando vesículas. A continuación, la célula se fragmenta generando los denominados cuerpos apoptóticos; estos serán fagocitados por macrófagos y otras células circundantes para su completa eliminación, evitando así la liberación del material intracelular que provocaría la aparición de inflamación^{lix}.

El proceso apoptótico está presente en el endometrio humano ayudando a mantener la homeostasis a lo largo del ciclo. Mediante apoptosis, se eliminan células senescentes de la capa funcional durante la fase secretora tardía y la fase menstrual. Además, cuando se produce el embarazo, permite la invasión regulada de la decidua por parte del trofoblasto^{lx}.

Los niveles de proteínas pro y anti-apoptóticas varían permitiendo el control del proceso de muerte celular. Diferentes estudios sugieren que las proteínas Bcl-2 y Bcl-X son importantes factores anti-apoptóticos en el endometrio humano, mientras proteínas tipo Bax, que pertenecen al grupo de factores pro-apoptóticos, inducen muerte celular formando canales de permeabilización en la membrana mitocondrial durante la fase

secretora. Por otra parte, la mayor expresión de Fas y FasL en la fase secretora activa las señales apoptóticas, vía receptores de muerte. La proteína anti-apoptótica Bcl-2 tienen su mayor expresión durante la fase proliferativa, mientras que los niveles de proteínas pro-apoptóticas como Bax son bajos durante esta fase y aumentan en la fase secretora, es decir, siguen un patrón contrario al de Bcl-2^{lxii}.

Estudios recientes sobre endometriosis, han sugerido que el éxito de la implantación ectópica de células endometriales, podría estar más relacionado con un defecto en la susceptibilidad a la apoptosis que con un exceso de proliferación^{lxiii}. Se ha descrito que el porcentaje de células apoptóticas en las 3 fases del ciclo endometrial es menor en mujeres que sufren endometriosis. Además, se ha observado una disminución en la apoptosis y en la capacidad de estas células endometriales ectópicas de ser reconocidas por los macrófagos en mujeres con endometriosis pélvica^{lxiii}. La resistencia a la apoptosis asociada al desarrollo de endometriosis podría deberse, al menos en parte, a la expresión más elevada de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, como se ha explicado anteriormente, que algunos autores han encontrado en las células endometriales de mujeres con endometriosis, aunque no se han encontrado diferencias en los niveles de Bax^{lxiv}. Estas anomalías en las células endometriales, pueden ser una condición permisiva previa constitutiva de las propias células o bien pueden reflejar el efecto de citoquinas locales. En cualquier caso, la disminución de la apoptosis podría contribuir a la supervivencia e implantación ectópica de células endometriales.

Además de Bcl-2, también se ha encontrado un patrón de expresión alterado del ya citado ligando de muerte FasL, de modo que en suero y fluido peritoneal de pacientes con endometriosis los niveles de FasL soluble y activo son elevados y pueden contribuir a la eliminación de

células inmunitarias que expresen Fas en su membrana, facilitando así la supervivencia de las células endometriales en la cavidad peritoneal^{lxv}. La fuente de FasL soluble pueden ser tanto las propias células endometriales como leucocitos peritoneales.

Otros factores genéticos podrían influenciar la susceptibilidad a la endometriosis, como por ejemplo la inactivación de genes supresores de tumores como PTEN. Estos datos, además, apoyan la relación existente entre la endometriosis y el cáncer de ovario^{lxvi}. Estudios recientes de micro-arrays han demostrado que en pacientes con endometriosis aparece alterada la expresión de numerosos genes, muchos de los cuales están relacionados con apoptosis y supresión de tumores, como es el caso de p53^{lxvii}.

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento de células endometriales estromales con AMPc y P4 induce decidualización y promueve la producción de factores solubles capaces de inducir apoptosis en las propias células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual *in vitro*^{lxviii}, tema en el que profundizaremos más adelante.

ANTECEDENTES: TIPOS CELULARES

Células deciduales/endometriales estromales

Las células más abundantes del endometrio humano son las células endometriales estromales (EnSC, Endometrial Stromal Cells).

El ciclo menstrual femenino se divide en dos etapas diferenciadas:

- La fase proliferativa, que se caracteriza por una proliferación de las células endometriales gracias al estímulo de un ambiente predominantemente estrogénico.

- La fase secretora. Se inicia tras la ovulación y degeneración del folículo ovulatorio en el conocido como cuerpo lúteo o cuerpo amarillo, el cual, va a iniciar la producción de progesterona. Durante esta fase y, sobre todo si el embarazo se produce, las EnSC se diferencian por efecto de la alta concentración de progesterona en lo que conocemos como decidua, cuya unidad celular fundamental son las células deciduales estromales (DSC, Decidual Stromal Cells). Durante el proceso de decidualización, las EnSC y las DSC acumulan glucógeno y lípidos (de ahí la función nutricia que les ha sido asignada clásicamente), aumentan su tamaño, y cambian su forma desde un aspecto fibroblástico a una morfología poligonal más característica de las células decidualizadas. Además, las células decidualizadas producen prolactina (PRL) y proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP-1), por lo que se les ha atribuido también una función endocrina local o paracrina^{lxxix}.

Nuestro grupo consiguió aislar DSC humanas y mantenerlas en cultivo, estableciendo distintas líneas celulares que nos permitieron identificar el fenotipo antigénico de estas células, definir sus funciones y establecer su origen y linaje^{lxx, lxxi, lxxii, lxxiii}. Aparte de las hipotéticas funciones nutricia y endocrina de las DSC/EnSC, diversos grupos, entre ellos el nuestro, han demostrado en humanos y ratón, que las DSC desarrollan distintas actividades inmunológicas, lo que confirma que estas células tienen un papel relevante en la interrelación inmunológica entre la madre y el feto y en la tolerancia materno-fetal. Concretamente son capaces de secretar citoquinas como la IL-11, el factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factores estimuladores de colonias (CSFs), IL-1 e IL-15, así como quimioquinas determinantes para el reclutamiento de leucocitos al sitio de implantación embrionaria^{lxxiv}.

Célula madre mesenquimal (MSC)

Las MSC son células estromales que poseen la capacidad de auto-renovarse y también de diferenciarse a múltiples linajes celulares distintos^{lxxv}. Pueden ser aisladas de varios tejidos, como el cordón umbilical, la médula ósea, el tejido adiposo, o incluso de la sangre menstrual o el endometrio, apoyando la teoría etiopatogénica de la endometriosis de la célula madre endometrial. Nuestro grupo y otros autores han conseguido diferenciar a los distintos linajes las EnSC/DSC obtenidas de las distintas fuentes, endometrio y decidua, demostrando que estas células presentan características de MSC.

En base a su expresión de STRO-1, un marcador de MSC, nuestro grupo fue el primero en proponer la relación de las DSC con las MSC^{lxxvi}. Esta posibilidad ha sido confirmada posteriormente por otros grupos en DSC y EnSC^{lxxvii}, además de comprobar la presencia de otros marcadores antigénicos que coinciden con los presentados en las MSC, como CD10, CD13, CD44, CD90, etc^{lxxxvii}.

Endometriosis y relación con la célula madre mesenquimal (MSC)

Es posible que las MSC migren desde la médula ósea a los diferentes tejidos para dar lugar a los distintos linajes mesenquimales: fibroblastos, adipocitos, osteoblastos, miofibroblastos, y probablemente también EnSC/DSC en el útero. Lógicamente, las células derivadas de este mismo precursor comparten una serie de características morfológicas, antigénicas y funcionales comunes, como se ha introducido en el apartado anterior.

Todo esto podría explicar la presencia de focos de endometriosis en lugares distantes a su localización eutópica o uterina, como la piel, el pulmón o el cerebro, los cuales no serían atribuibles a la menstruación

retrógrada, sino a un *homing erróneo*, o migración errónea, de los precursores de EnSC relacionados con MSC. Por otra parte, las dos hipótesis, menstruación retrógrada y *homing erróneo*, no tienen por qué ser incompatibles ya que podrían representar dos formas distintas de la enfermedad.

Los focos de endometriosis incluyen EnSC y células epiteliales. La presencia de ambos tipos de células en estos focos peritoneales es fácilmente comprensible en la menstruación retrógrada, pero también pueden explicarse con la hipótesis del *homing erróneo*. La detección de células epiteliales y estromales procedentes del donante en el endometrio de mujeres trasplantadas de médula ósea^{lxxviii} sugiere la existencia de un precursor común o dos precursores independientes que, procediendo de la médula ósea, colonizarían el endometrio. Estos resultados coinciden con experiencias en ratón en las que se demuestra que células de médula ósea humana colonizan endometrio y focos de endometriosis experimentales diferenciándose en células epiteliales y estromales^{lxxix}. Aunque estos dos posibles precursores (estromal y epitelial) han sido localizados en distintas zonas histológicas del endometrio normal^{lxxx}, es más difícil aceptar que dos precursores independientes colonicen erróneamente un tejido no endometrial para dar lugar a los focos de endometriosis. Es más probable, por tanto, la existencia de un solo precursor que derive en células epiteliales y estromales. Por último, el hecho de que tanto las MSC como las EnSC puedan diferenciarse en células epiteliales^{lxxxi}, apoya la existencia de un precursor único que colonizaría en condiciones normales el endometrio, y el tejido no endometrial en aquellos casos de endometriosis, derivando en ambos casos en células epiteliales y estromales.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las EnSC procedentes de focos de endometriosis presentan características que las diferencian de las EnSC normales, como una mayor resistencia a la apoptosis y al efecto citotóxico de las células NK, mayor expresión de HLA-G, y resistencia a la progesterona, entre otras. Se ha descrito que el endometrio habitual o eutópico de mujeres con endometriosis presenta también una respuesta alterada a la progesterona^{lxxxii} y se ha encontrado una expresión disregulada de numerosos genes diana de la progesterona en el endometrio secretor de dichas pacientes^{lxxxiii}. Sin embargo, otros estudios han identificado un gran número de genes y microARN expresados de forma diferencial en el endometrio ectópico y eutópico de mujeres con endometriosis, que pueden regular vías moleculares implicadas en la patogenésis de la endometriosis^{lxxxiv lxxxv lxxxvi}; Teague et al., 2010). Por tanto, a día hoy se desconoce si las alteraciones detectadas en las EnSC de focos de endometriosis son constitutivas, y están presentes en el endometrio eutópico, o son inducidas o adquiridas en la localización ectópica.

Con todo ello, nuestra hipótesis es que los focos de endometriosis se originan debido a precursores relacionados con MSC que llegan, bien por menstruación retrógrada o bien por vía sanguínea desde la médula ósea (*homing erróneo*), y colonizan el tejido ectópico. En este tejido no endometrial, debido a la acción de factores intrínsecos y de factores locales del entorno, dichos precursores se diferencian a EnSC, proliferan y adquieren las características propias de las EnSC de los focos de endometriosis.

El objetivo general de esta tesis doctoral es comparar el fenotipo antigénico, las características funcionales y la respuesta a la progesterona y a la decidualización de las EnSC de pacientes con endometriosis y de donantes sanas, obteniendo dichas células de distintos tipos de muestras: focos de endometriosis de pacientes con dicha patología, biopsia de endometrio de ambos tipos de donantes, así como sangre menstrual de donantes sanas.

Este objetivo general se concreta en los siguientes específicos:

1. Aislar y obtener líneas celulares de EnSC procedentes de focos de endometriosis (eEnSC) y comparar sus características con las de EnSC eutópicas de las mismas pacientes (eBEnSC) y con EnSC eutópicas de donantes sanas obtenidas de dos fuentes diferentes: de biopsia endometrial (BEnSC), como células equivalentes a las del endometrio de pacientes; y de sangre menstrual (mEnSC), como fuente más similar a los quistes de chocolate o endometriomas.
2. Determinar las diferencias fenotípicas que puedan existir entre las diferentes líneas celulares.
3. Estudiar la respuesta a la decidualización con progesterona y AMPc en los diferentes grupos celulares objeto de estudio.

Se analizarán y compararán los cambios morfológicos, la producción de prolactina, la inducción de apoptosis, los cambios en el perfil fenotípico y la capacidad de migración en respuesta a la decidualización.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se han estudiado grupos celulares de EnSC de dos tipos de pacientes: pacientes con endometriosis y pacientes sanas. A su vez, en ambos grupos, las localizaciones de las que se han obtenido las muestras de estudio han sido diferentes.

Pacientes con endometriosis

Todas las pacientes con endometriosis integradas en el estudio se encontraban en edad fértil y fueron operadas por una sospecha clínica o por técnicas de imagen de endometriosis. La última guía de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (*ESHRE, European Society of Human Reproduction & Embryology*) en 2022 recoge que no es necesario un diagnóstico histológico para hacer un diagnóstico definitivo de endometriosis^{lxxxvii}. Sin embargo, en el momento en que se llevaron a cabo las distintas cirugías de este estudio, el diagnóstico definitivo de endometriosis se realizó de forma intraoperatoria, lo cual fue posteriormente constatado mediante el estudio histológico de la muestra, confirmando la presencia de endometriosis en la misma.

El motivo de la cirugía en la mayoría de los casos fue por la clínica de dolor derivada de la propia endometriosis, teniendo en todas ellas una sospecha de endometriosis severa, lo que en la clasificación de la ASRM correspondería a un grado III-IV. Los casos restantes de pacientes con endometriosis intervenidas lo formaron pacientes en las que el motivo fundamental de la cirugía fue por esterilidad teóricamente causada por la endometriosis como primera opción.

Se obtuvieron muestras de las localizaciones donde había endometriosis, lo cual se catalogó como una localización ectópica; pero también se obtuvieron biopsias de la localización habitual o eutópica del propio endometrio.

Las muestras de localización ectópica se obtuvieron del contenido achocolatado del interior de los quistes de endometriosis.

Con el fin de ser lo menos intervencionistas posible, las biopsias eutópicas se obtuvieron de forma “indirecta”: todas las pacientes fueron intervenidas por laparoscopia, y en todos los casos se empleó, de forma rutinaria para facilitar la cirugía, un sistema de movilización uterina externa mediante el uso de un vástago intrauterino. Tras finalizar la cirugía, se extrajo el vástago y se tomaron como muestras de tejido eutópico los restos de endometrio adheridos al mismo. De esta forma se evitó una intervención añadida a la propia cirugía de endometriosis para la obtención de la muestra de endometrio eutópico.

Las pacientes fueron intervenidas por el mismo equipo quirúrgico en dos hospitales de la Comunidad de Madrid, España: Hospital Quiron Ruber Juan Bravo y Hospital La Zarzuela.

Donantes sanas

En el caso de las donantes sanas también se estudiaron dos tipos de muestras, aunque en este caso de la misma localización (eutópica o uterina) con la finalidad de que el tamaño muestral fuera lo más amplio posible, aunque también, de forma secundaria, con el objetivo de conocer si existen diferencias entre las dos fuentes de obtención.

Por un lado, se obtuvieron muestras directamente de sangre menstrual, recogidas a través de copas menstruales o tampones y donadas por mujeres sanas de entre 20 y 35 años. La sangre menstrual se considera el mejor modelo para comparar con el chocolate de los quistes de endometriosis.

Además, se obtuvieron muestras de tejido endometrial, equivalentes a las muestras de endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis, mediante biopsia dirigida. Estas biopsias se llevaron a cabo mediante abordaje histeroscópico en mujeres menores de 40 años sobre las que se realizaba dicha intervención por otros motivos, excluyéndose aquellos casos en los que hubiera sospecha de un proceso neoplásico maligno. La histeroscopia es un procedimiento endoscópico por el cual se accede a la cavidad uterina con una óptica milimétrica, permitiendo la obtención de estas muestras endometriales bajo visión directa con el uso de tijeras y pinzas. Todas las histeroscopias se llevaron también a cabo en los dos centros hospitalarios citados previamente: Hospital Quiron Ruber Juan Bravo y Hospital La Zarzuela, Madrid.

En ambos casos se excluyeron aquellas mujeres que estuvieran tomando algún tipo de medicación crónica diferente a tratamientos hormonales, o aquellas con enfermedades infecciosas, autoinmunes, sistémicas o locales.

Todas las donantes, tanto sanas como pacientes con endometriosis, aportaron su consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Universidad de Granada.

Resumen de las muestras obtenidas

Pacientes con endometriosis

- eEnSC:
 - Células endometriales ectópicas, en foco de endometriosis.
 - 30 muestras.
- eBEnSC:



- Células endometriales eutópicas, biopsia endometrial.
- 15 muestras.

Pacientes sanas

- BEnSC:
 - Células endometriales eutópicas, biopsia endometrial histeroscópica.
 - 12 muestras.
- mEnSC:
 - Células endometriales eutópicas, sangre menstrual.
 - 30 muestras.

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

La sangre menstrual y las muestras de endometriosis se diluyen en tampón fosfato salino PBS (Phosphate-Buffered Saline) (*Gibco, California, USA*) y se centrifugan sobre un gradiente de Ficoll-Histopaque (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*), a 2200 rpm y a 20°C durante 20 minutos. Las células obtenidas en la interfase son recogidas y se lavan con PBS, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. A continuación, el pellet de estas células se resuspende en medio de cultivo Opti-MEM (*Gibco, California, USA*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (*Gibco, California, USA*) al 3%, 100 IU/ml de penicilina, 100 IU/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*). Las células se siembran en frascos de cultivo con una superficie de 25 cm² o 75 cm². Después de 24 horas a 37°C y 5%CO₂ se retiran las células en suspensión, seleccionando las células adheridas a la superficie del frasco.

La obtención de las células endometriales estromales procedentes de biopsias, tanto de mujeres sanas como de mujeres con endometriosis, se

realiza mediante explante: las muestras se depositan en una placa de Petri estéril y a continuación son cortadas con un bisturí estéril en partes más pequeñas de alrededor de 1-3 mm³. Estas muestras son recogidas con unas pinzas estériles y se lavan con PBS para eliminar posibles restos sanguíneos. A continuación, el tejido se dispone en un frasco de cultivo T25, de manera que la muestra queda en contacto directo con la superficie del frasco. Al igual que con las mEnSC y eEnSC, se le añade medio del cultivo completo, como se explica en el apartado anterior, en la cantidad necesaria de manera que cubra toda la superficie, pero evitando que el tejido quede flotando. Este proceso permite la migración de las células y su proliferación. El medio de cultivo se cambia cada 3 días evitando mover la muestra depositada en la superficie del frasco de cultivo. Las células van emergiendo del explante al cabo de 5 a 10 días. Cuando el explante está totalmente rodeado de células, se recoge y se deja que las células proliferen hasta llegar al 80-90% de confluencia para luego ser tripsinizadas y subcultivadas como se indica a continuación.

Los cultivos celulares se mantienen lavando las células con PBS y cambiando el medio Opti-MEM suplementado cada 2 o 4 días, en función de la confluencia. Cuando las células llegan a una confluencia de aproximadamente un 90% sobre la superficie del frasco, se realiza un pase o subcultivo. Para ello, las células se despegan de la superficie de crecimiento con tripsina/EDTA (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*), que posteriormente se inactiva con FBS. Tras realizar un lavado con PBS y centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, las células se siembran a una menor concentración.

A continuación, se exponen imágenes del cultivo celular de cada una de las líneas estudiadas (Figura 9).

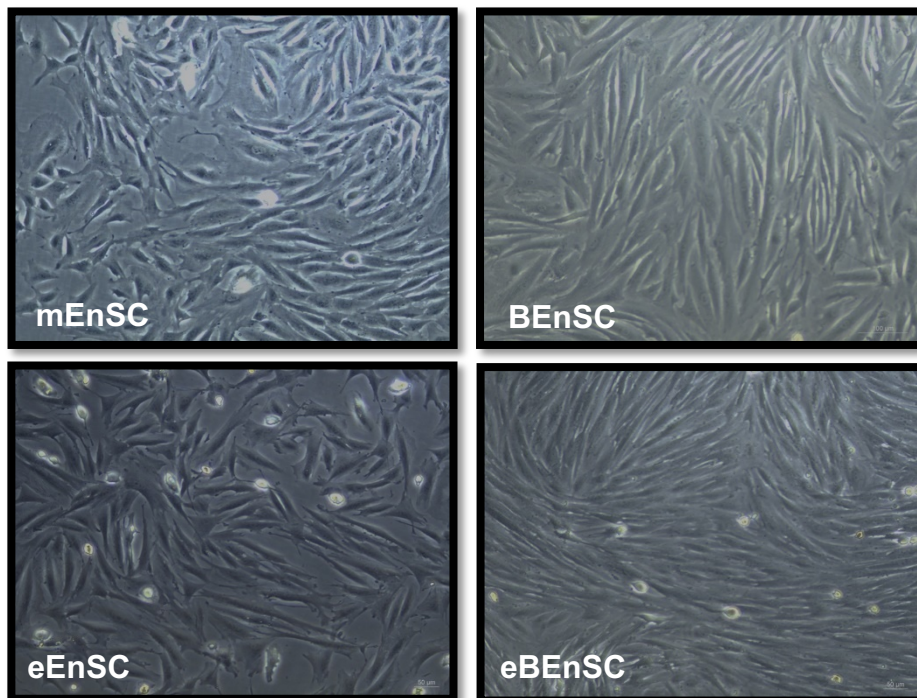


Figura 9. Imágenes de áreas representativas del cultivo de las diferentes líneas celulares

En el medio Opti-MEM, las líneas celulares mostraron un fenotipo antigénico y unas actividades funcionales estables durante 8-12 semanas (hasta 10 pases)^{lxxxviii}.

ANÁLISIS DEL FENOTIPO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La determinación del fenotipo antigénico de los distintos grupos celulares se llevó a cabo mediante el análisis por citometría de flujo. Para ello, se despegan las células con tripsina/EDTA, se lavan con PBS y el pellet se resuspende en PBS con albúmina de suero bovino (BSA 0,5%) y EDTA 2 mM, con el fin de bloquear los receptores Fc y evitar uniones

inespecíficas de los anticuerpos utilizados. La concentración de células por cada tubo de citometría es de 10^5 células/100 μ l de PBS-BSA.

Para el marcaje con **anticuerpos extracelulares directos**, se añaden los anticuerpos frente a los antígenos a estudiar (dilución 1/25) y sus isotipos correspondientes (dilución 1/25) y se incuba durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las células son lavadas con 2 ml de PBS y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el pellet se resuspende en 200 μ l de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo.

Para el marcaje con **anticuerpos extracelulares indirectos**, se sigue el procedimiento anteriormente descrito, pero, tras el lavado las células se resuspenden en PBS-BSA, se añaden los anticuerpos secundarios correspondientes a la concentración indicada en la casa comercial ($\leq 0,25$ μ g/ 10^6 células) y se deja en incubación durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, se añaden 2 ml de PBS a cada muestra y se centrifuga a 1500 rpm 5 minutos a 4°C. El pellet se resuspende finalmente en 200 μ l de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo.

Para el marcaje **intracelular directo**, se tripsinizan las células del frasco de cultivo, se añaden 2 ml de PBS y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspende en 100 μ l/ 10^5 células de Cytofix/Cytoperm (*Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA*) y se incuba durante 20 minutos a 4°C, con el fin de fijar las células. Transcurrido este tiempo, se añaden 2 ml de PBS-saponina (*Merck, Darmstadt, Germany*) al 0,05%, para permeabilizar la membrana celular. Tras centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y el pellet se resuspende en 100 μ l de PBS saponina. A continuación, se añaden los anticuerpos (dilución 1/50) y sus isotipos correspondientes (dilución 1/25) y se incuban durante 30 minutos a 4°C

en oscuridad. Tras este tiempo se lavan las células con PBS y finalmente el pellet se resuspende en 200 μ l de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo.

Para el marcaje **intracelular indirecto**, se sigue el mismo protocolo descrito para el marcaje intracelular directo. Después de la incubación con el anticuerpo primario (dilución 1/50), se añade 2 ml de PBS-saponina y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se desecha el sobrenadante y se vuelve a resuspender en PBS-saponina, añadiendo ahora el anticuerpo secundario (dilución 1/50) e incubando durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Después de esta última incubación se lava con 2 ml de PBS y se centrifuga a 1500 rpm 5 minutos. El pellet obtenido se resuspende en 200 μ l de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo.

Tras la preparación de las células para detectar los diferentes antígenos estudiados, se mide la fluorescencia (detectores FL1, FL2, FL4), teniendo en cuenta el tamaño (detector *Forward Scatter*) y complejidad celular (detector *Side Scatter*) para seleccionar nuestra población celular y excluir restos celulares, con un citómetro de flujo FACSCalibur (*Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA*).^{lxxxix}

Los datos obtenidos de la citometría fueron analizados mediante el software *FlowJo* (v.10, *FlowJo LLC*).

Los anticuerpos monoclonales utilizados para la citometría de flujo se muestran en la tabla 2:

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa Comercial
Anti-human CD10	PE	HI10a	Biolegend
Anti-human CD29	APC	TS2/16	Biolegend
Anti-human CD31	FITC	WM59	Biolegend
Anti-human CD44	FITC	BJ18	Biolegend
Anti-human CD73	PE	AD2	Biolegend
Anti-human CD105	-	43A3	
Anti-human CD140b	PE	18A2	Biolegend
Anti-human CD146	APC	P1H12	Biolegend
Anti-human SUSD2	APC	W5C5	Biolegend
Cytokeratin	-	C-11	Biolegend
Podoplanine	Alexa Fluor 647	NC-08	Biolegend
α -SMactin	FITC	1A4	Sigma-Aldrich
Mouse IgG1,k Isotipe	FITC	MOPC-21	Biolegend
Mouse IgG1,k Isotipe	PE	MOPC-21	Biolegend
Mouse IgG1,k Isotipe	APC	MOPC-21	Biolegend
Mouse IgG2,k Isotipe	Alexa fluor 488	MOPC-21	Biolegend
Mouse IgG2,k Isotipe	PE	MOPC-21	Biolegend
Goat Anti-Mouse IgM	FITC	Poly4053	Thermo Fisher Scientific
Goat Anti-Mouse IgG	PE	Poly4053	Thermo Fisher Scientific

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la determinación de antígenos mediante citometría de flujo. FITC; isocionato de fluoresceína, APC; alofococianina, PE; ficoeritrina. Las muestras incubadas con citoqueratina y CD105, son marcadas con los anticuerpos secundarios reflejados en la tabla.

DECIDUALIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Para el proceso de decidualización de las líneas células, se siembran las células tanto en frascos de cultivo de 75 cm², como en placa de 6 pocillos (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), para poder realizar los distintos estudios de fenotipo, apoptosis y producción de prolactina. Cuando las células alcanzan el 70% de confluencia se añade al medio Opti-MEM, complementado como se ha explicado anteriormente, con los factores AMPc y progesterona (P4) a una concentración de 300 nM y 500 μ M respectivamente (Sigma-Aldrich, S, Louis, USA). El medio con AMPc y



P4 es cambiado y reemplazado por medio fresco cada 4 días hasta completar 28 días de decidualización.

La decidualización se confirma por la observación del cambio de morfología y la toma de imágenes que verifican dicho cambio, así como por la expresión de prolactina que se cuantifica mediante RT-PCR.

Paralelamente, a partir de las diferentes líneas de células endometriales estromales cultivadas en los frascos de cultivo de 75 cm², se recogen los medios condicionados (CM) para los ensayos de migración. Estos medios condicionados se recolectan después de 12 días de incubación, tanto de células decidualizadas con P4 y AMPc, como de las células no decidualizadas, y se conservan congelados a -80°C hasta su uso.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Para llevar a cabo el estudio morfológico de células decidualizadas y no deciduales se adquieren imágenes de áreas representativas de cultivos de ambos tipos con un microscopio óptico Leica DMI8 (Leica, Alemania) equipado con una cámara digital. Las imágenes se procesan utilizando el software gratuito *Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij>). Se cuentan las células con morfología fibroblástica y las que tienen aspecto redondeado y los resultados finales se expresan como el porcentaje de células con morfología redondeada, con respecto al total de células contadas.

DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Durante la decidualización en placas de 6 pocillos, las células se recogen cada 7 días para determinar el porcentaje de células apoptóticas. Las células apoptóticas hipodiploides se detectan mediante citometría de flujo de acuerdo con los procedimientos publicados^{xc}. Brevemente, las células

son despegadas con 1 ml de Tripsina-EDTA. A continuación, las células se lavan con PBS, se centrifugan durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C y se retira el sobrenadante. El pellet de células se resuspende en 100 μ l de PBS y se le añade 900 μ l de etanol frío al 70 % durante 5 minutos para su fijación. Después se lavan con PBS y se centrifugan a 3500 rpm 2 minutos a 4°C. Se desecha el sobrenadante y el pellet se tiñe durante 30 minutos con una mezcla de yoduro de propidio a una concentración de 1 μ g/ml (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) y ARNasa 10 μ g/ml (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*). Las células apoptóticas en fase sub-G1 del ciclo celular se analizan en un citómetro *FACSCalibur* con el software *Cell Quest* (*BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.*). La determinación de la proporción de células apoptóticas se realiza mediante el software *FlowJo*.

RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

El ARN total se extrae de células resuspendidas en TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*) y conservadas a -80°C. Las células son descongeladas en frío y a continuación puestas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Siguiendo el protocolo, se añaden 200 μ l de cloroformo (*Merck KGaA*) por mililitro de TRIzol y a continuación se centrifuga a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recoge la fase acuosa donde se encuentran los ácidos nucleicos y esta fase se transfiere a un nuevo tubo donde se le añaden 500 μ l de isopropanol. Esta solución se conserva una noche a -20°C, y de esta manera se favorece la precipitación de los ácidos nucleicos. Tras este tiempo, se centrifuga a 12500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recoge el pellet desechando el sobrenadante. Este pellet se lava con etanol 75% en agua DEPC (*Merck KGaA*) con el fin de inactivar las ARNasas y se centrifuga a 12500 rpm 5 minutos a 4°C. A continuación, se retira el sobrenadante y las muestras se dejan secar

durante 3 minutos a temperatura ambiente, para eliminar cualquier resto de etanol que pudiera quedar. El pellet seco se reconstituye en 20 μ l de agua DEPC y se incuba durante 10 minutos a 55-60 $^{\circ}$ C. Las muestras se cuantifican en un NanoDropTM 2000 (*Thermo Fisher Scientific*) y se conservan a -80 $^{\circ}$ C hasta la síntesis de ADN complementario (ADNc).

El ADNc se sintetiza utilizando el *kit Access RT-PCR System (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.)* con cebadores Oligo-dT de acuerdo con el protocolo del fabricante. Antes de la síntesis de ADNc, las muestras de ARN son procesadas según el siguiente protocolo: el ARN extraído se trata con ADNasa I (*DNaseI RNase-free, Thermo Scientific*) para eliminar cualquier resto de ADN genómico. Se parte de una concentración de ARN de 1 μ g, al cual se le añaden 13 μ l de NFW (Nuclease Free-Water), 1 μ l de ADNasa I y 1 μ l de tampón de reacción. A continuación, se incuba durante 30 minutos a 37 $^{\circ}$ y se añade 1 μ l de EDTA por cada muestra para luego incubar a 65 $^{\circ}$ C entre 10-15 minutos. A continuación, la retrotranscripción se lleva a cabo usando los siguientes volúmenes de reacción:

Mezcla de Retrotranscripción	Volumen
Tampón de retrotranscripción 10x	2 μ l
MgCl ₂	4 μ l
dNTP mix (10mM)	2 μ l
Oligo(dT) ₁₅ (0,5mg/mL)	1 μ l
Inhibidor de RNAsas (rRNasin)	0,5 μ l
Retrotranscriptasa AMV	0,6 μ l
NFW	1,9 μ l
Muestra de ARN (0,5 μ g) o NFW	8 μ l
Volumen final de reacción	20 μ l

Tabla 3. Mezcla de reacción para la retrotranscripción

A partir de esta mezcla de retrotranscripción, la reacción se lleva a cabo en un termociclador (*2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems*) con los siguientes ciclos y temperaturas:



El ADNc obtenido se conserva a -20°C hasta su análisis mediante PCR cualitativa.

Para la PCR convencional se parte de $1\ \mu\text{g}$ de ADNc y se amplifica utilizando el kit *PCR Master Mix (Promega)* partiendo de los siguientes volúmenes de reacción:

Mezcla de amplificación ADN total	Volumen
Tampón PCR Master Mix 2x	12,5 μl
Oligonucleótido 5' (10 μM)	0,5 μl
Oligonucleótido 3' (10 μM)	0,5 μl
Muestra de ADNc o NFW	1 μl
NFW	10,5 μl
Volumen final de reacción	25 μl

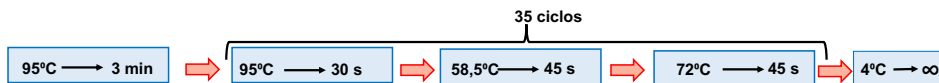
Tabla 4. Mezcla de reacción para la PCR

Se han utilizado los siguientes oligonucleótidos, obtenidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neira, Granada, España:

Gen de interés	Secuencia	TM	Ciclos	Amplificación (pb)
<i>PROLACTINA</i>	5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3' 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	59 $^{\circ}\text{C}$	35	276
<i>GADPH</i>	5'-TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3' 5'-GGGTTCATTACCAAGGCCATC-3'	59 $^{\circ}\text{C}$	35	87

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos utilizados para la PCR cualitativa

La reacción se lleva a cabo en el termociclador *2720 Thermal Cycler* con los siguientes ciclos y temperaturas:



Los productos de PCR se separan por tamaños en geles de agarosa al 1,5 % (*Seakem LE Agarose for gel electrophoresis, Lonza Group, Basilea, Suiza*) a un voltaje de 100 voltios durante 60 minutos. Estos productos son teñidos con GelRed (*BiotiumInc, Fremont, CA, EE. UU.*) y se incluye un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*Bench Top 100bp DNA Ladder, Promega, Wisconsin, USA*) y los correspondientes controles positivos y negativos del gen de interés. Los productos de la PCR se visualizan usando el programa QuantityOne GelPrinter Utra.

ENSAYO DE INVASIÓN O CIERRE DE LA HERIDA

Para determinar la capacidad invasiva de las distintas líneas celulares en respuesta a los medios condicionados (CM) procedentes de células no decidualizadas y decidualizadas, se procede a la siembra de las células en placas de 96 pocillos hasta alcanzar el 95% de confluencia y se realiza un *scratch* o herida en la monocapa celular utilizando una punta de micropipeta estéril de 200 μ l. A continuación, se elimina el medio de cultivo con restos celulares procedentes de la realización de la herida y se reemplaza con los diferentes medios condicionados utilizados en el experimento (*Opti-MEM*, CM de células indiferenciadas o CM de células decidualizadas). La toma de imágenes se lleva a cabo a tiempo inicial (T0) y después de 24, 48 y 72 horas utilizando un aumento de 50x en un microscopio óptico *Leica DMI8* equipado con una cámara digital. Las imágenes se procesan utilizando el software gratuito *Image J*. El área libre de células en cada punto de tiempo se resta del área libre de células a T0 y los resultados se expresan como porcentaje del área cubierta.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se siembran 50000 células en 200 μ l del medio de cultivo requerido en una placa de 96 pocillos negra de fondo transparente (*NUNC 96 well, Thermo Fisher Scientific* TM, 165305). Se incuba durante 72 horas y a continuación se retira el medio de cultivo y se le añaden 90 μ l de medio de cultivo fresco y 10 μ l del reactivo resazurina (*PrestoBlue, Thermo Fisher Scientific, A13261*). Se mantiene 4 horas a 37°C y, durante este periodo de tiempo, las células que son metabólicamente activas procesan la resazurina (que tiene capacidad de penetrar en las células vivas), reduciéndola y pasando así de un color azul a un color rojo. Este cambio es detectado mediante fluorescencia (Excitación 560 nm/Emisión 590 nm), en un fluorímetro *Infinite M200 PRO* y analizado a través del programa iControl (Figura 10).

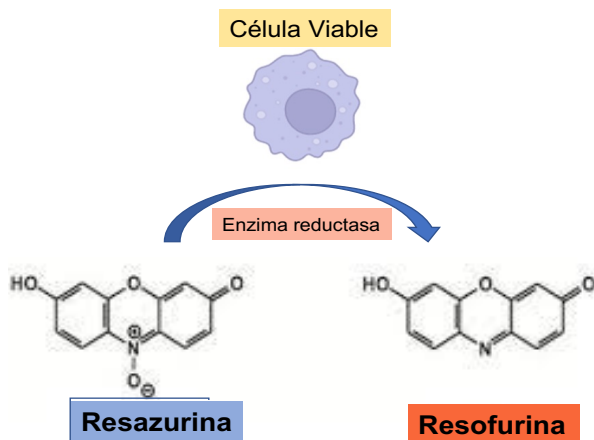


Figura 10. Mecanismo de acción del reactivo Resazurina



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con diferentes líneas celulares. El análisis estadístico se realizó utilizando el software *GraphPad Prism 6*. Las comparaciones se llevaron a cabo utilizando la prueba t de dos colas no pareadas con la corrección de Welch. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)



RESULTADOS

Datos epidemiológicos

Donantes con endometriosis

Se estudiaron las muestras obtenidas de un total de 30 pacientes con endometriosis, 15 de las cuales también aportaron muestras de localización no solo ectópica (eEnSC) sino también eutópica (eBEnSC).

La edad media de las donantes con endometriosis fue de 40,1 años. Veintidós de ellas (el 73,3%) estaban con algún tipo de tratamiento hormonal previo a la cirugía, generalmente gestágenos, y el motivo principal de la cirugía fue por dolor (25 de 30, lo que supone un 83,3%). Las 5 pacientes restantes se intervinieron con idea de mejorar su fertilidad. En cuanto al tipo de cirugía empleada, en 20 casos fue cirugía conservadora (66,6%) frente a 10 casos de cirugía radical con histerectomía y doble anexectomía (33,3%).

De forma paralela, analizamos los datos de otras pacientes que en su momento fueron donantes pero que sus células no pudieron ser empleadas en este estudio debido a su baja o nula tasa de crecimiento.

El número total de estas pacientes fue 14 y su edad media fue significativamente menor que la de las pacientes en las que sí se obtuvo crecimiento celular (35,3 años, $p < 0,05$), sugiriendo que el factor edad puede suponer un dato a tener en cuenta al valorar el crecimiento celular, pudiendo poner en relación a pacientes de edad más avanzada que presentan una enfermedad compleja de varios años de evolución con mayor crecimiento celular si se les compara con pacientes jóvenes de reciente diagnóstico.

Otro dato significativo fue que en las pacientes en las que no hubo crecimiento celular, el dolor no fue la indicación quirúrgica más frecuente, sino todo lo contrario, suponiendo tan solo un 28,6% de las indicaciones (4 de 14), habiendo sido operadas la mayoría por otro motivo y

habiéndose obtenido la endometriosis como un hallazgo casual de la cirugía. Este dato resulta significativo y parece poner en relación la actividad de la endometriosis, que se asocia con la clínica causada, con el crecimiento celular.

El resto de parámetros, como el tratamiento previo o el tipo de cirugía, fueron similares a los de las pacientes en las que sí hubo crecimiento celular (71,4% de pacientes con tratamiento previo y 71,4% de cirugías conservadoras vs 73,3% y 66,6% respectivamente en los casos en los que sí hubo crecimiento celular).

Donantes sanas

Con respecto a las donantes sanas, como ya se ha citado, se tomaron dos tipos de muestras: 30 procedentes de sangre menstrual (mEnSC) y 12 de biopsia endometrial tomada por histeroscopia (BEnSC).

La edad media de las donantes de sangre menstrual fue de 29 años. 10 de ellas (33,3%) estaban empleando algún tipo de tratamiento hormonal.

Por su parte, la edad media de las donantes de biopsia endometrial fue de 33 años. Las indicaciones de la histeroscopia para la toma de biopsia fueron 9 por esterilidad (75%), 2 por pólipos endometriales (16,6%), tomándose la biopsia de otra zona; y 1 por sangrado menstrual anómalo (8,4%).

Establecimiento de líneas celulares

El cultivo de todas las líneas celulares de estudio mostró, en el análisis fenotípico mediante citometría de flujo, marcadores característicos de células endometriales estromales. Se comprobó la pureza de los cultivos mediante el estudio de antígenos específicos de este tipo de células, considerándose un cultivo válido en aquellos casos en los que se

demonstró la doble expresión de CD10 y CD29 o CD73, así como la ausencia de CD45, CD31 y citoqueratina^{xc}. En la figura 11 se puede observar cómo las células endometriales estromales procedentes de distintos orígenes presentan la doble positividad para CD10 y CD29, confirmando que se está trabajando con una población pura y homogénea.

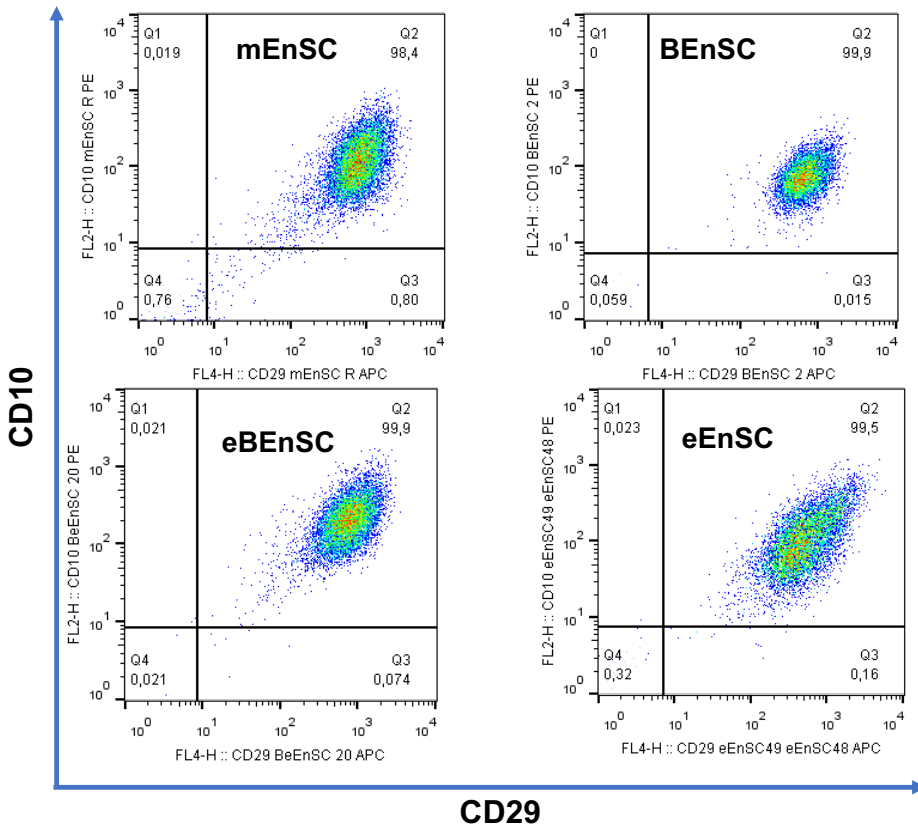


Figura 11. Análisis de pureza de las diferentes líneas células endometriales estromales. Ejemplos representativos de líneas procedentes sangre menstrual (mEnSC), biopsia de mujeres sanas (BEnSC), focos de endometriosis (eEnSC) y de biopsia endometrial de paciente con endometriosis (eBEnSC) en los que se comprueba la doble positividad para CD10/CD29.

Las células endometriales estromales del tejido endometrial ectópico y eutópico exhiben un fenotipo antigénico similar

El perfil antigénico de las EnSC obtenidas a partir de la sangre menstrual se ha analizado exhaustivamente previamente^{xcii}. En el presente trabajo, estudiamos el fenotipo antigénico de las líneas celulares de EnSC procedentes de endometriomas (eEnSC) (Figura 12) y lo comparamos con el de mEnSC y EnSC obtenidas de biopsias endometriales de mujeres con y sin endometriosis (eBEnSC y BEnSC respectivamente). Más del 90% de las células en todas las líneas celulares expresaron el marcador propio de EnSC CD10^{xciii} así como los biomarcadores propios de MSC CD29, CD44 y CD73, y carecían de la expresión de CD31 y citoqueratina (Figuras 12 y 13, Tabla 6). También exhibieron niveles similares de CD146 y α -SM actina. La expresión de CD105 mostró variabilidad no solo entre las diferentes líneas celulares sino también entre muestras del mismo tipo celular, aunque en ningún caso resultó ser significativa (Figura 13).

Por otra parte, los marcadores CD140b, podoplanina y SUSD2 presentaron cierto grado de variabilidad, siendo su expresión significativamente mayor en mEnSC en comparación con el resto de líneas celulares (Figura 13).

En conjunto, el perfil de expresión de antígenos de estas líneas resultó equivalente al de MSC de médula ósea, como se observa en la Tabla 6 en la que se comparan las MSC con eEnSC y mEnSC.

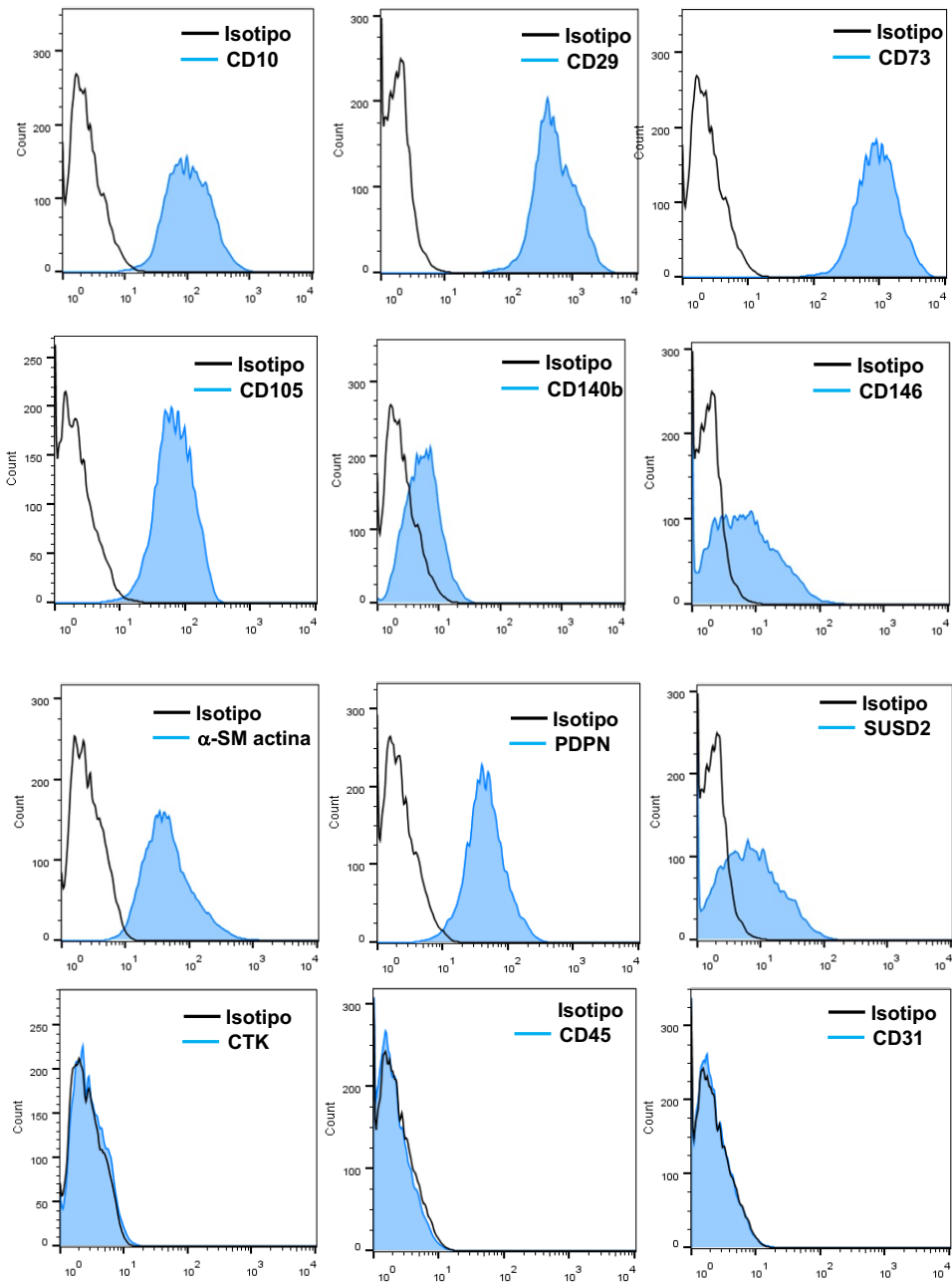


Figura 12. Fenotipo antigénico de las células endometriales estromales de focos de endometriosis. Expresión de antígenos, determinada mediante citometría de flujo, en una línea representativa de eEnSC.

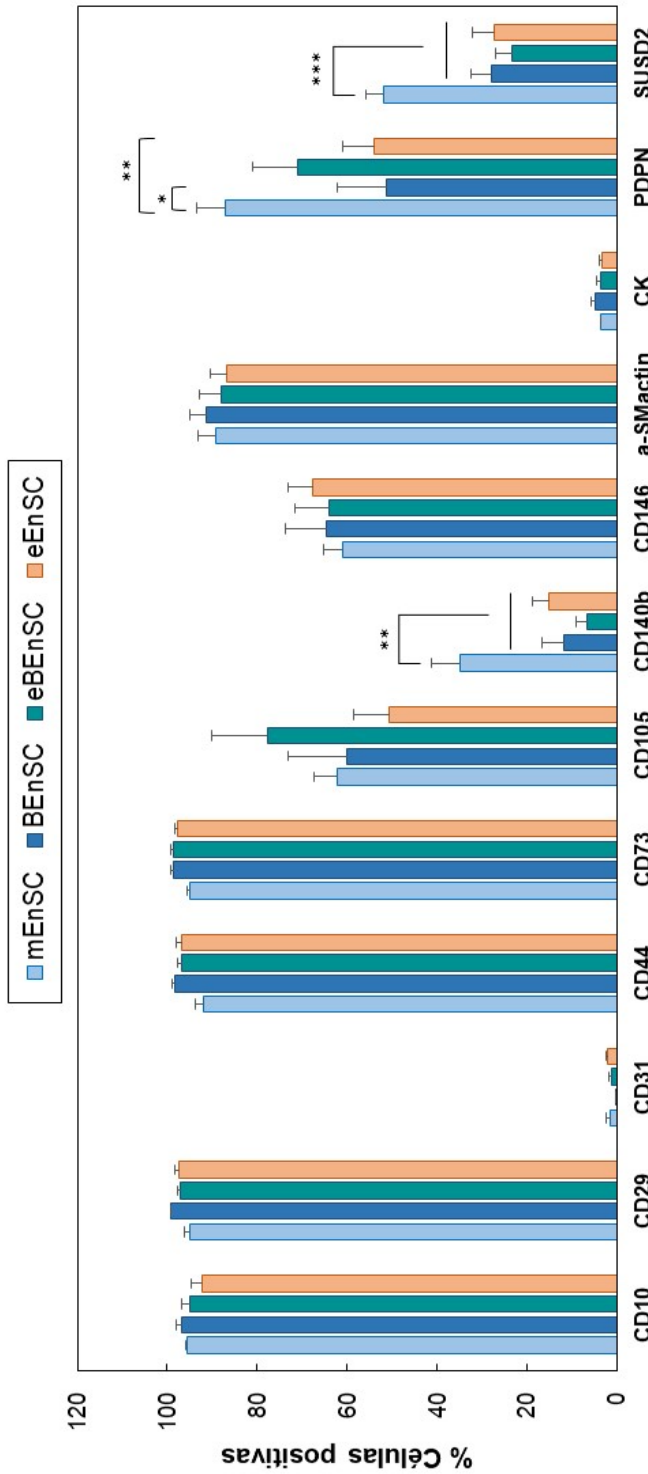


Figura 13: Fenotipo antigénico de las células endometriales estromales ectópicas y eutópicas obtenidas de las diferentes fuentes. Líneas celulares de mEnSC, BEEnSC, eBEEnSC y eEnSC se tiñeron con anticuerpos para diferentes antígenos y se analizaron mediante citometría de flujo. Los gráficos representan la media del porcentaje de células positivas para los marcadores indicados. Las barras de error muestran la SEM para 10 (mEnSC), 7 (BEEnSC y eBEEnSC) y 15 (eEnSC) líneas celulares diferentes.

% Células Positivas			
Antígeno	MSC	eEnSC	mEnSC
CD10	>95	>95	>95
CD29	>95	>95	>95
CD31	<1	<1	<1
CD34	<1	<1	<1
CD44	>95	>95	>95
CD45	<1	<1	<1
CD73	>95	>95	>95
CD90	>95	>95	>95
CD146	68-75	50-95	35-85
α -SM actina	>95	>95	>95
HLA-G	<1	0-18	3-20
CTK	<1	<1	<1
NESTINA	>95	2-50	76-98
PODOPLANINA	>95	40-95	50-95
SUSD2	21-35	2-50	34-79

Tabla 6. Expresión de antígenos en MSC de médula ósea, eEnSC y mEnSC, determinada mediante citometría de flujo.

Dado que disponíamos de líneas celulares obtenidas tanto del endometrio ectópico como del eutópico de la misma paciente en algunas donantes con endometriosis, realizamos un análisis comparativo de los marcadores más variables (CD105, CD140b, CD146, PDPN y SUSD2) en ambos tipos de células de dichas pacientes. Los resultados se exponen en la figura 14, y muestran cómo no existe un patrón definido o similar de expresión de estos antígenos en las líneas eEnSC y eBEnSC de la misma paciente, a excepción del CD140b, cuya expresión parece ser siempre igual o mayor en las líneas de eEnSC.

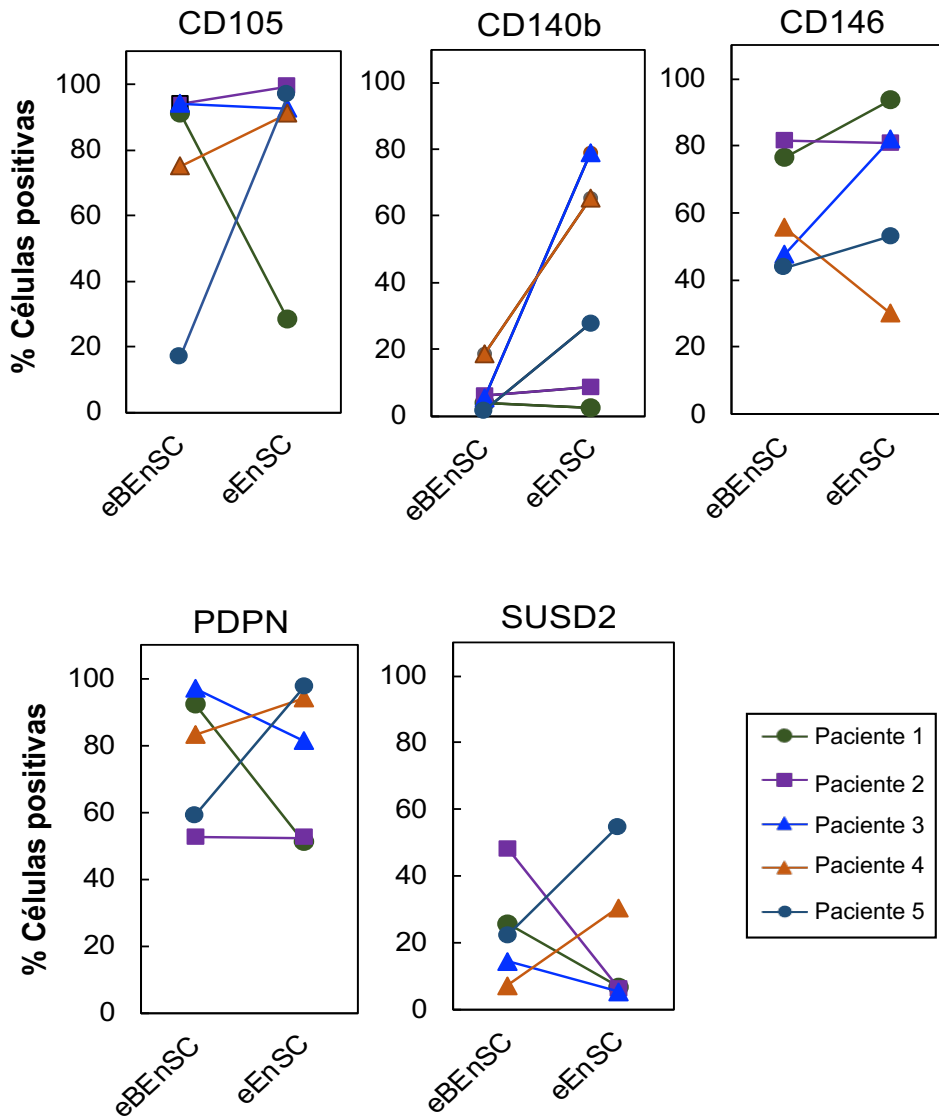


Figura 14. Análisis comparativo de la expresión de antígenos en células eutélicas y ectópicas de pacientes con endometriosis. La expresión de los antígenos indicados se analizó mediante citometría de flujo en las líneas de eBE.nSC y eEnSC obtenidas de cinco pacientes con endometriosis. Se representa el porcentaje de células positivas para cada antígeno estudiado.

Efectos de la decidualización sobre el fenotipo y la supervivencia de EnSC de mujeres con endometriosis

Con el fin de comparar la capacidad de decidualización de las distintas líneas celulares obtenidas de las diferentes fuentes, se trataron las células con P4 y AMPc durante 20 días.

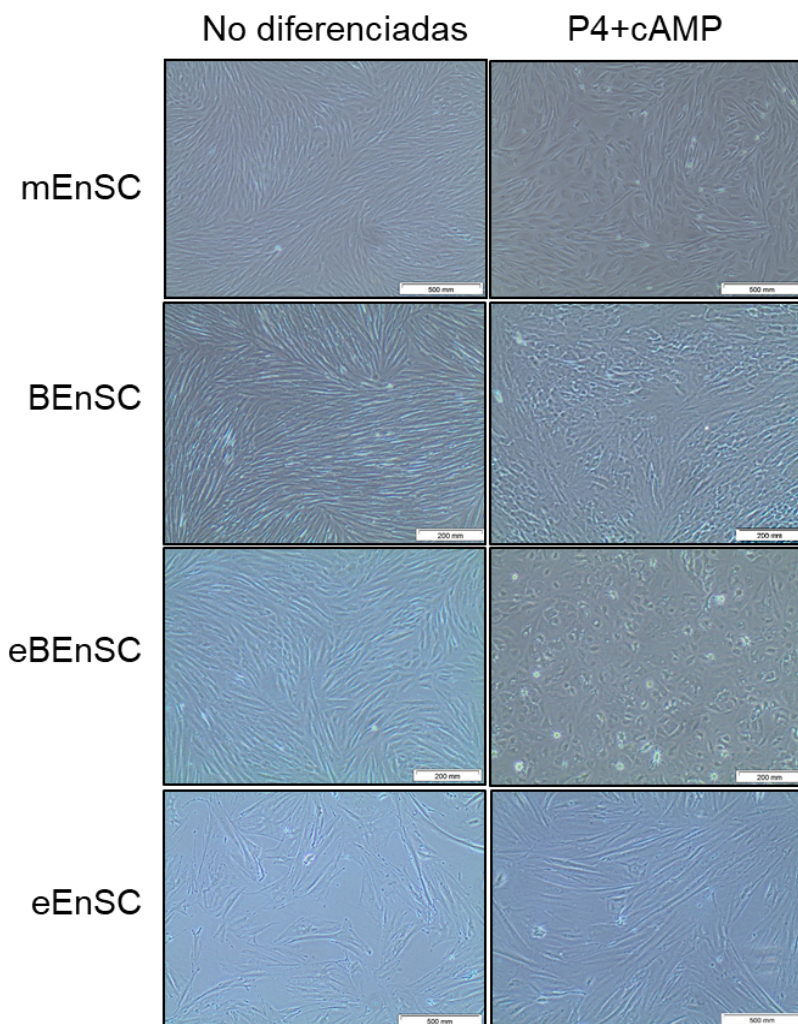


Figura 15. Cambios morfológicos en respuesta a la decidualización. Imágenes representativas de mEnSC, BEnSC, eBEnSC y eEnSC tras decidualización con P4 y AMPc durante 20 días, apreciándose cambio de morfología de células de aspecto fibroblástico a células redondeadas en todas las líneas excepto en las eEnSC que mantienen la morfología fibroblástica.

Como se muestra en la figura 15, tras los 20 días de tratamiento se pudo observar que, mientras que las mEnSC, BEnSC y eBEnSC experimentaron un cambio morfológico similar, pasando de una apariencia fibroblástica a una forma más redonda característica de las células decidualizadas, las eEnSC apenas alteraron su morfología al visualizarlas al microscopio.

Las imágenes obtenidas al microscopio fueron cuantificadas valorándose el número de células redondeadas por campo y expresándolo en porcentaje antes y después de la decidualización, como se aprecia en la figura 16. Se analizaron varios campos representativos tras 3 experimentos por tipo celular. Se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tras la decidualización en todas las líneas celulares excepto en las eEnSC.

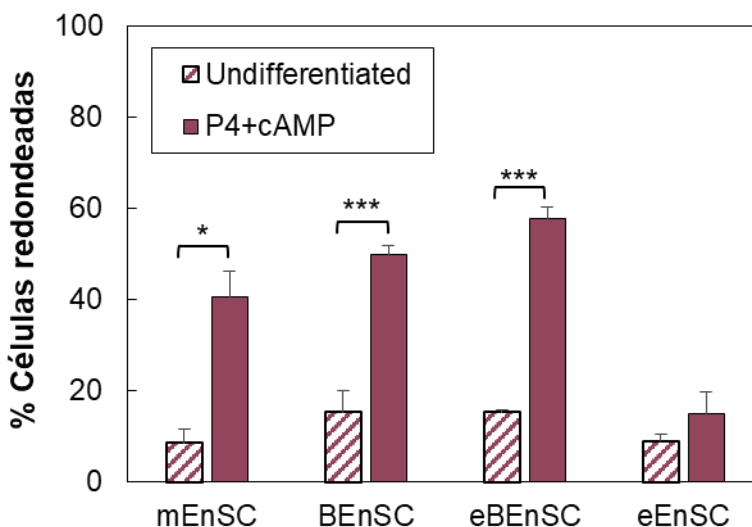


Figura 16. Porcentaje de células redondeadas tras las decidualización. Cuantificación de áreas representativas de los 4 tipos celulares objeto de estudio antes y después de la decidualización con P4 y AMPc durante 20 días. Las barras de error muestran la SEM de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares.

Por otro lado, se analizó comparativamente la expresión de prolactina en respuesta al tratamiento con P4 y AMPc en los cuatro tipos celulares, como marcador característico del proceso de decidualización, mediante RT-PCR. Como control interno de carga se analizó también la expresión del gen GAPDH. Este experimento puso de manifiesto cómo la decidualización indujo notablemente la expresión de prolactina en todas las líneas celulares excepto en las eEnSC, en las que se observó un nivel mucho más bajo de ARNm de prolactina en respuesta al tratamiento con P4 y AMPc (Figura 17).

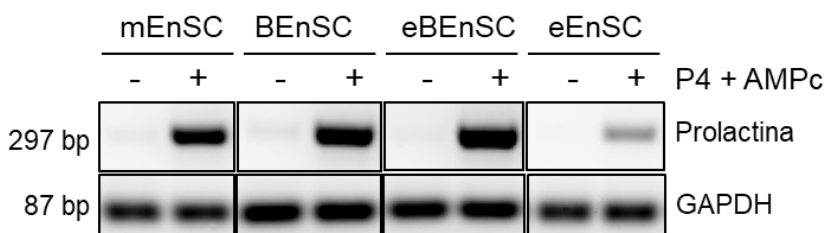


Figura 17. Expresión de prolactina en respuesta a la decidualización. Detección mediante RT-PCR de la expresión de PRL por todas las líneas celulares tras la decidualización con P4 y AMPc, siendo comparadas con el gen GAPDH como control.

Como se ha citado previamente, nuestro grupo ha demostrado que la decidualización promueve la producción de factores solubles capaces de inducir apoptosis en las propias células endometriales estromales^{xciv}, y, dado que esta apoptosis ocurre de forma paralela a la decidualización^{xcv}, decidimos comparar la sensibilidad de las diferentes líneas celulares a la apoptosis inducida por este proceso. Para ello se les indujo la decidualización con P4 y AMPc. El experimento se realizó utilizando 8 líneas diferentes obtenidas de distintas donantes, tanto de mEnSC como de eEnSC y 5 líneas diferentes también obtenidas de distintas donantes de BEnSC y eBEnSC. Se establecieron dos grupos, uno de decidualización y otro de las mismas células sin decidualizar, y se

determinó el porcentaje de células apoptóticas analizando el porcentaje de células en fase sub-G1 del ciclo celular cada 7 días mediante citometría de flujo, hasta alcanzar un máximo de 28 días de cultivo.

Tras estos experimentos, se observó un aumento de la inducción de apoptosis en las mEnSCs y BEnSCs que resultó directamente proporcional al tiempo de tratamiento con P4 y AMPc (Figura 18). El porcentaje de células apoptóticas fue significativamente superior en ambos grupos celulares tras 21 días de tratamiento con P4 y AMPc, al compararlo con el de las células sin decidualizar. En las mEnSC estas diferencias resultaron significativas desde los primeros 7 días de tratamiento.

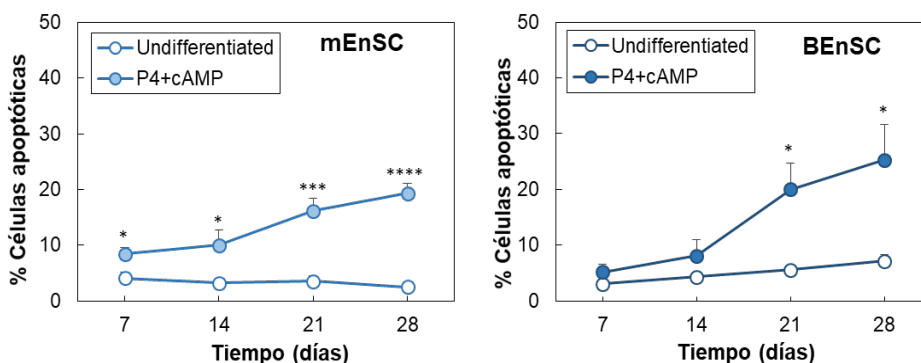


Figura 18. Inducción de apoptosis en mEnSC y BEnSC en respuesta a la decidualización. Comparación del porcentaje de células apoptóticas en las líneas mEnSC y BEnSC decidualizadas con P4+AMPc y no decidualizadas, analizándose mediante citometría de flujo cada 7 días. Las barras de error muestran la SEM para cada periodo de tiempo.

Sin embargo, al analizar la inducción de apoptosis tras el tratamiento con P4 y AMPc en las líneas celulares procedentes de pacientes con endometriosis, no solo encontramos la resistencia a este proceso de muerte celular en las de origen ectópico (eEnSC), como era esperable dada su ya descrita mayor expresión de proteínas antiapoptóticas, sino

que también se observó dicha resistencia en las células de origen eutópico (eBEnSC), tal y como se observa en la figura 19.

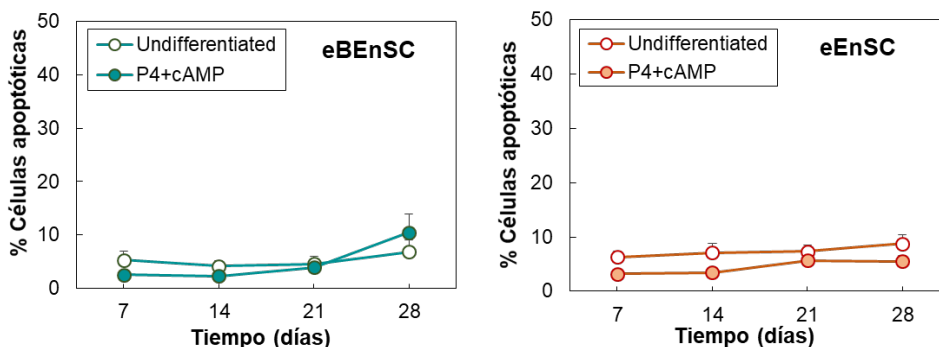


Figura 19. Inducción de apoptosis en eBEnSC y eEnSC en respuesta a la deciduación. Comparación del porcentaje de células apoptóticas en las líneas procedentes de pacientes con endometriosis, tanto eutópicas (eBEnSC) como ectópicas (eEnSC), deciduadas con P4+AMPc y no deciduadas, analizándose mediante citometría de flujo cada 7 días. Las barras de error muestran la SEM para cada periodo de tiempo.

Tras los resultados obtenidos, demostrando la menor capacidad de las células procedentes de focos de endometriosis para sufrir cambios de morfología y expresar prolactina en respuesta a la deciduación, en comparación con el resto de líneas celulares, y la resistencia a la apoptosis de las células tanto eutópicas como ectópicas de mujeres con endometriosis, nos dispusimos a comprobar si este proceso de diferenciación afectaba por igual al perfil antigénico de todas las líneas estudiadas. El análisis del fenotipo se realizó tras 20 días de deciduación.

La expresión de marcadores distintivos de células endometriales estromales, como CD10 y CD29, no cambió en respuesta a la deciduación en ninguna de las líneas celulares. Además, la proporción de células CD146+ y SUSD2+ no varió significativamente con la

decidualización, aunque en todas las líneas, con la excepción de las eEnSC, se observó una tendencia a la disminución de ambos marcadores en las células decidualizadas (Figura 20).

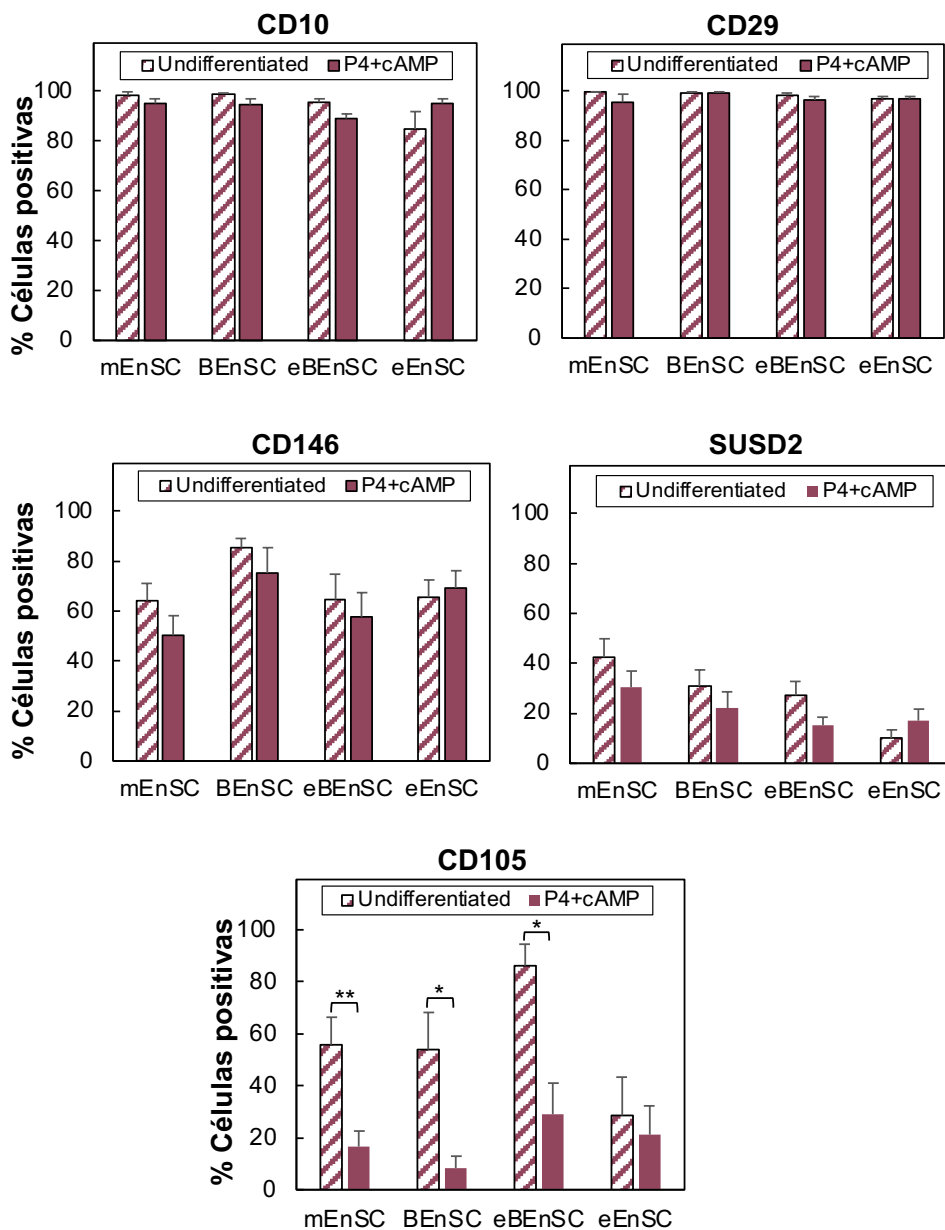


Figura 20.

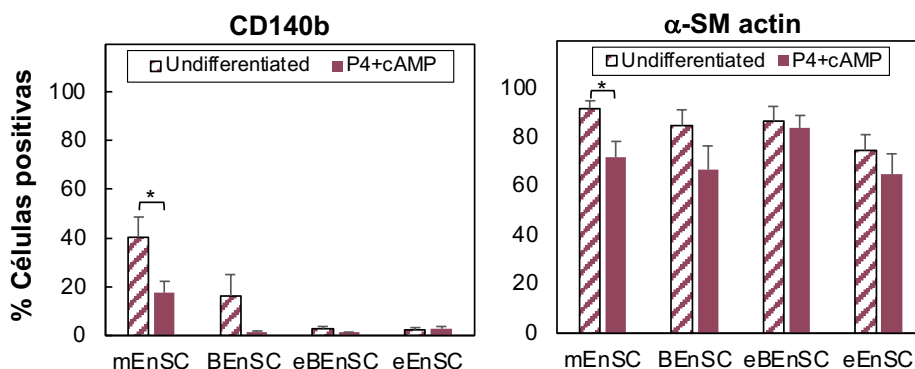


Figura 20. Análisis comparativo del fenotipo antigénico tras la decidualización. La expresión de antígenos se determinó mediante citometría de flujo en mEnSC, BEnSC, eBEnSC y eEnSC después de la incubación durante 20 días sin (no diferenciadas) o con P4 y AMPc. Los gráficos de barras representan el porcentaje medio de células positivas para cada antígeno. Las barras de error muestran la SEM de al menos cinco (mEnSC y eEnSC) y tres (BEnSC y eBEnSC) líneas celulares diferentes.

En cuanto a la expresión de CD105, observamos que se modulaba significativamente a la baja en respuesta al tratamiento con P4 y AMPc en todos los tipos de células excepto en las eEnSC (Figuras 20 y 21). Además, encontramos que los niveles de CD140b y α -SM actina disminuyeron significativamente en las mEnSC decidualizadas (Figuras 20, 22 y 23), observándose también una reducción leve, aunque no significativa, de ambos antígenos en las BEnSC tras la decidualización (Figura 20).

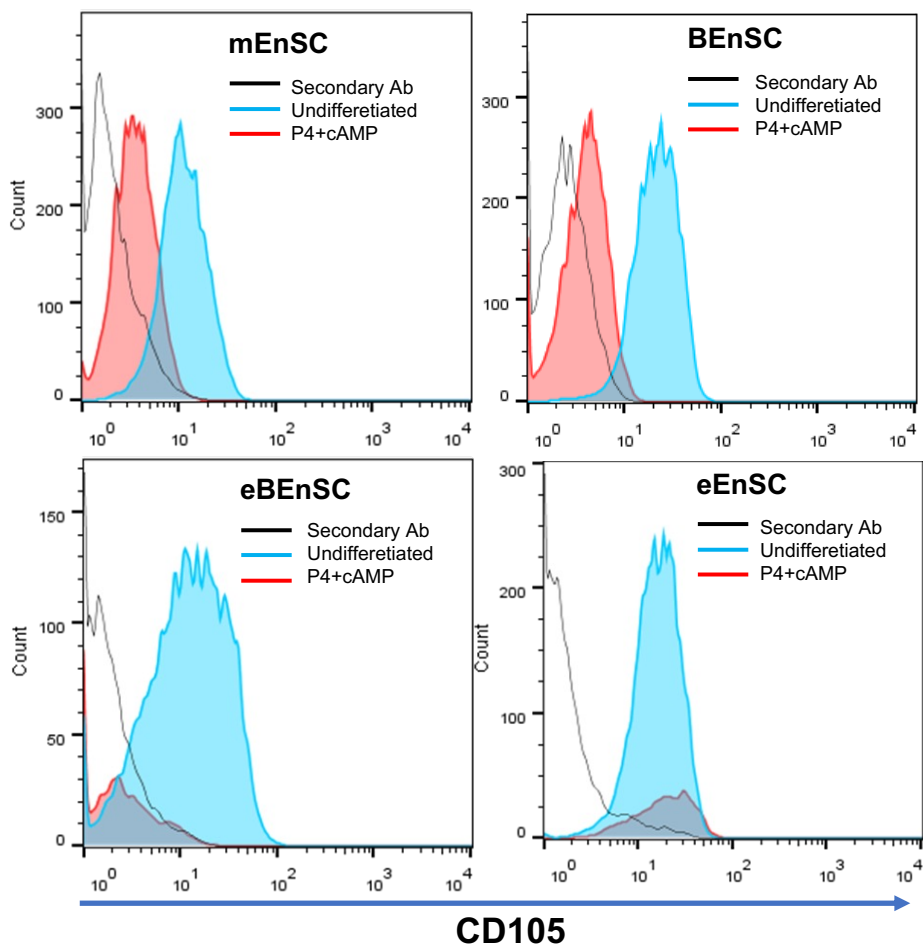


Figura 21. Cambios en la expresión de CD105 en respuesta a la decidualización. Histograma representativo de la pérdida de expresión del marcador fenotípico CD105 en las diferentes líneas celulares mEnSC, BEnSC, eBEnSC y eEnSC tras 20 días de decidualización.

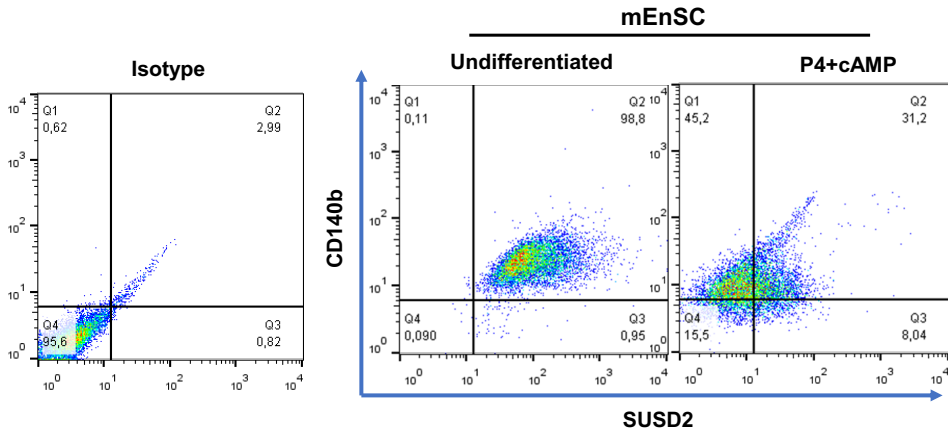


Figura 22. Cambios en la expresión de CD140b en mEnSC tras la decidualización. Citograma representativo de la pérdida de expresión del marcador fenotípico CD140b/SUSD2 en células mEnSC tras 20 días de decidualización.

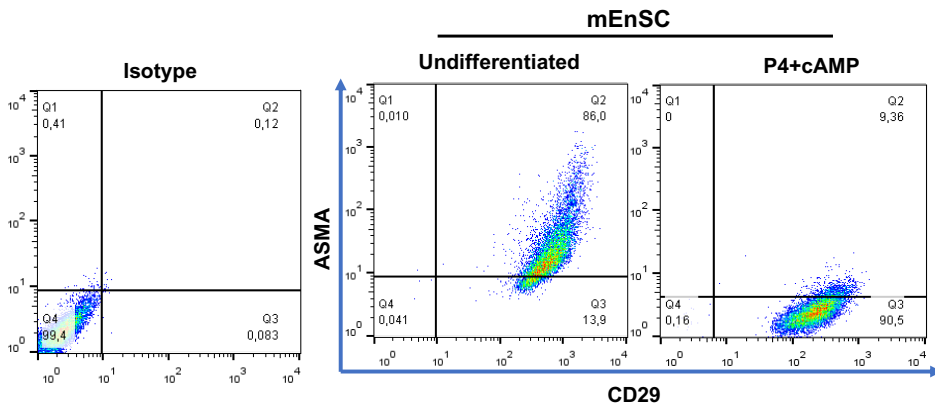


Figura 23. Cambios en la expresión de α -SM actina en mEnSC tras la decidualización. Citograma representativo de la pérdida de expresión del marcador fenotípico α -SM actina (frente a CD29) en células mEnSC tras 20 días de decidualización.

En resumen:

- No hay cambios en marcadores típicos de células endometriales estromales como CD10, CD29.
- No hay cambios significativos en CD146, ni SUSD2.
- Hay una disminución en la expresión de CD105 en todas las líneas excepto en eEnSC.
- Hay un descenso significativo de CD140b y α -SM actina en mEnSC.

Efectos de la decidualización sobre la capacidad de migración de las EnSC eutópicas y ectópicas

En condiciones de decidualización, hay estudios que han demostrado una reducción en la motilidad de las células endometriales estromales eutópicas, mientras que las células endometriósicas parecen conservar su capacidad de migrar^{xcvi xcvii}

Con el fin de caracterizar mejor las diferencias en el comportamiento de las células eutópicas y ectópicas realizamos distintos experimentos relacionados con la capacidad de migración de eEnSC, como modelo patológico con localización ectópica, y de mEnSC, como modelo de célula con localización eutópica equivalente a las eEnSC. Estos experimentos consistieron en la incubación de ambos tipos de células con el medio obtenido de cultivos de las mismas, a los que llamamos medios condicionados (CM). Diferenciamos a su vez entre CM obtenidos de cultivos de células no diferenciadas, es decir, no decidualizadas (CM-U) y de células decidualizadas (CM-D). Como grupo control se realizaron cultivos de los mismos tipos celulares empleando medio OptiMEM.

De esta manera, trabajamos con un total de 5 medios de cultivo para co-cultivar con cada línea celular (mEnSC y eEnSC):

- CM de mEnSC no diferenciadas (CM mEnSC-U).
- CM de mEnSC decidualizadas (CM mEnSC-D).
- CM de eEnSC no diferenciadas (CM eEnSC-U).
- CM de eEnSC decidualizadas (CM eEnSC-D).
- Medio Optimem como grupo control.

Una vez incubadas las células con dichos medios se llevó a cabo el ensayo de migración conocido como ensayo de cierre de la herida a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 horas, tal como se explica de forma más detallada en el apartado de material y métodos.

Encontramos que los dos tipos de líneas celulares, mEnSC y eEnSC, presentaban perfiles similares de migración tras su incubación con los 5 tipos diferentes de medios de cultivo (Figura 24). La migración de mEnSC y eEnSC aumentó de manera similar y dependiente del tiempo tras la incubación con OptiMEM y CM de células no diferenciadas (CM-U), alcanzándose, en general, valores por encima del 80% del cierre de la herida a las 48 horas de incubación. Por el contrario, la motilidad de mEnSC y eEnSC se redujo significativamente cuando se cultivaron con CM de células decidualizadas (CM-D) a todos los puntos temporales analizados.

Las diferencias más notables en la migración se observaron cuando las dos líneas celulares, tanto eutópicas procedentes de sangre menstrual como ectópicas procedentes de focos de endometriosis, fueron incubadas con los medios condicionados procedentes de mEnSC y eEnSC decidualizadas. Aunque ambos medios condicionados decidualizados inhibieron la capacidad invasiva tanto de mEnSC como de eEnSC (Figura 24, barras azules y naranjas), el efecto inhibitor de la migración fue significativamente más potente cuando ambas líneas

celulares fueron incubadas con los medios condicionados de mEnSC decidualizadas (CM mEnSC-D, barras azules) que cuando se incubaron con los medios condicionados de eEnSC decidualizadas (CM eEnSC-D, barras naranjas).

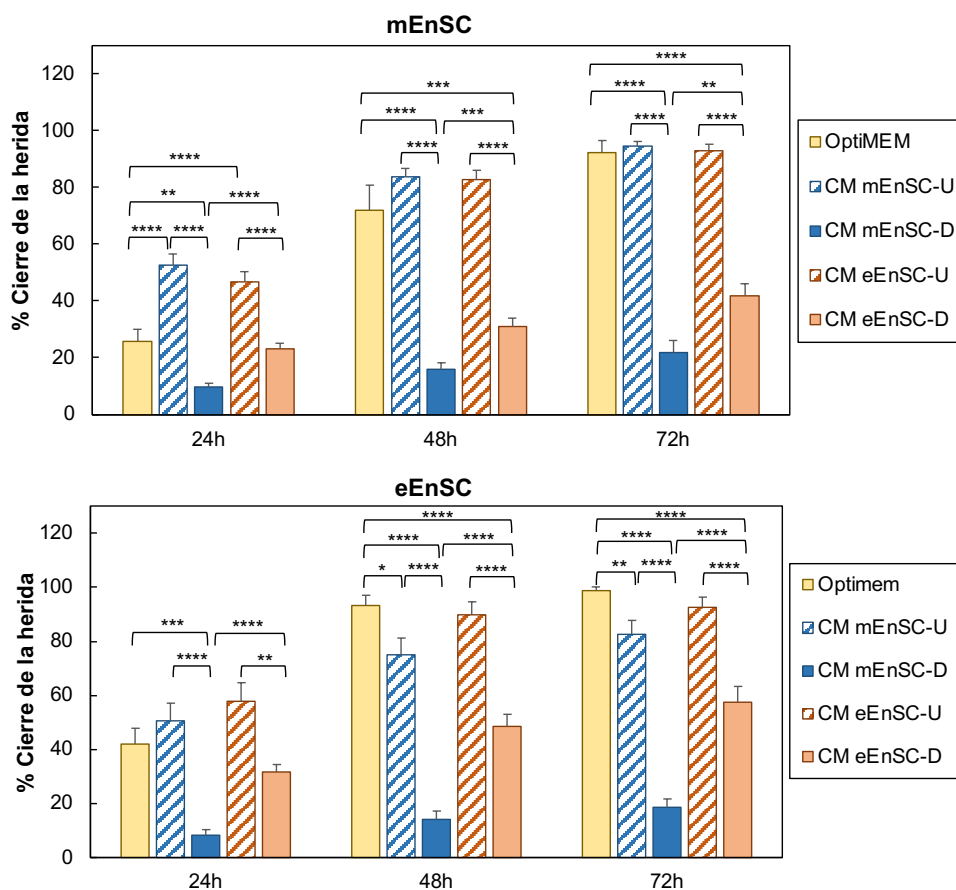


Figura 24. Efecto de los medios condicionados de células endometriales estromales no diferenciadas y decidualizadas de sangre menstrual de donantes sanas (mEnSC) y endometriomas (eEnSC), sobre la migración de células endometriales estromales de localización ectópica y eutópica. En las gráficas se representa la migración de mEnSC (gráfica superior) y eEnSC (gráfica inferior) estudiada mediante el ensayo de cierre de la herida tras incubación durante 24, 48 y 72h con medio Optimem, como grupo control, y los CM de mEnSC y eEnSC decidualizadas (CM -D) y no decidualizadas (CM -U). El cierre de la herida se representa como el porcentaje de área cubierta con respecto al momento 0 o momento de realización de la herida. Las barras de error muestran la SEM de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares.

Las imágenes del ensayo de cierre de la herida de la figura 25, obtenidas al microscopio óptico, demuestran la menor de la migración de mEnSCs y eEnSCs cuando fueron cocultivadas con el CM-D procedente de mEnSC (paneles de la izquierda) que cuando se cocultivaron con el CM-D procedente de eEnSC (paneles de la derecha). Además, observamos como las células eEnSC en contacto con el CM-D de otras líneas de eEnSC (panel derecho inferior), presentaban una menor inhibición de la migración que las mEnSC incubadas con estos mismos medios condicionados (panel derecho superior).

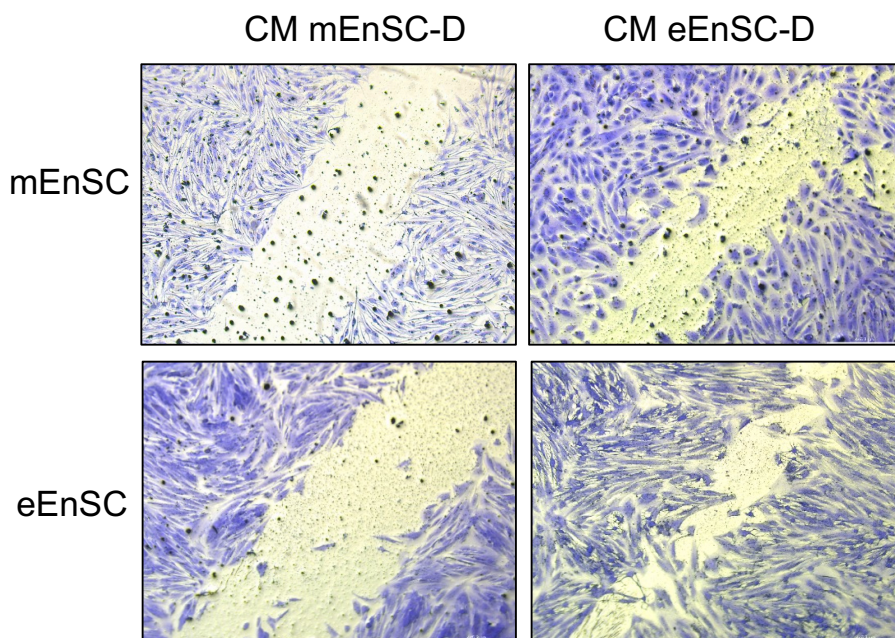


Figura 25. Efecto de los medios condicionados de mEnSC y eEnSC decidualizadas sobre la movilidad. Se muestran imágenes de microscopio del ensayo de cierre de la herida, representativas del efecto de los dos tipos de medios condicionados de células decidualizadas (de mEnSC en paneles izquierdos y de eEnSC en paneles derechos) sobre los dos grupos celulares de estudio (mEnSC paneles superiores y eEnSC paneles inferiores), tras 72 horas de incubación.

Para completar este estudio, se llevó a cabo el ensayo de cierre de la herida con los mismos medios condicionados, en las mismas condiciones y a los mismos tiempos, sobre las células endometriales estromales de localización eutópica de donantes sanas (BEnSC) y de pacientes con endometriosis (eBEnSC) (Figura 26).

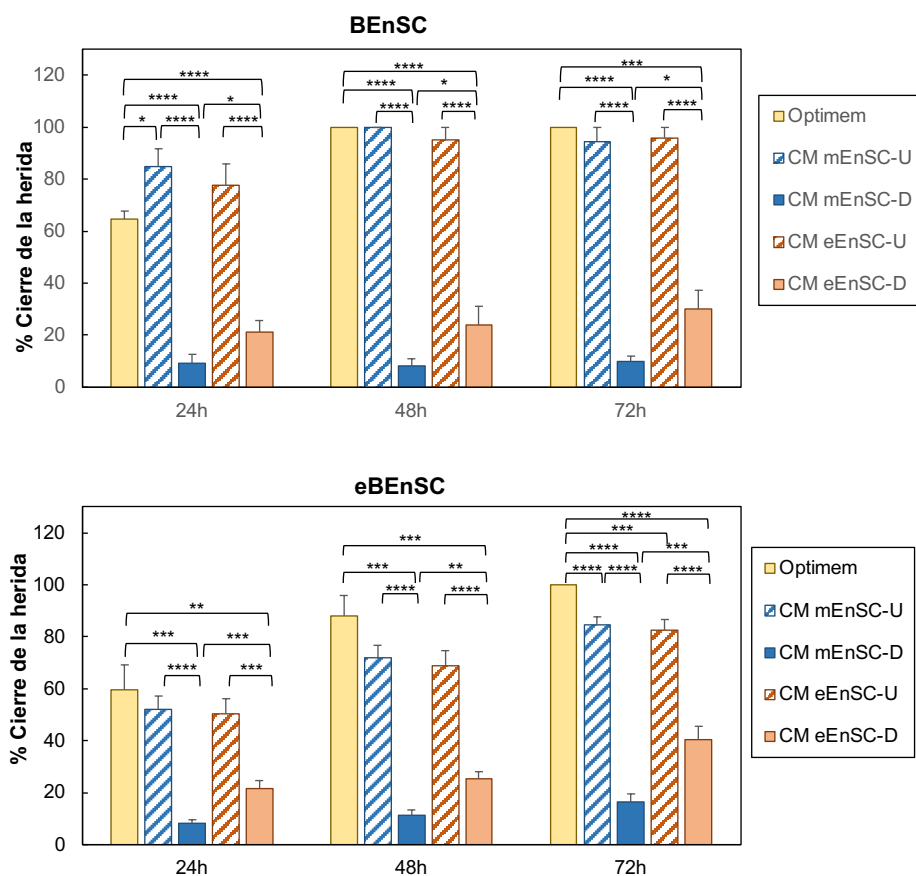


Figura 26. Efecto de los medios condicionados de mEnSC y eEnSC no diferenciadas y decidualizadas sobre la migración de EnSC de localización eutópica de donantes sanas y pacientes con endometriosis. En las gráficas se representa la migración de BEnSC (gráfica superior) y eBEnSC (gráfica inferior) estudiada mediante el ensayo de cierre de la herida tras incubación durante 24, 48 y 72h con medio Optimem, como control, y los CM de mEnSC y eEnSC decidualizadas (CM -D) y no decidualizadas (CM -U). El cierre de la herida se representa como el porcentaje de área cubierta con respecto al momento 0. Las barras de error muestran la SEM de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares.

En ambos casos el perfil de migración que se observó fue similar al previamente obtenido con mEnSC y eEnSC (Figura 24), encontrando de nuevo una inhibición de la migración de las células incubadas con los CM de mEnSC y eEnSC decidualizadas y siendo el efecto inhibitor del CM de las primeras (Figura 26, barras azules) significativamente mayor que el de las segundas (Figura 26, barras naranjas).

Dado que habíamos observado diferencias en la migración de mEnSC y eEnSC cuando se incubaban con los CM de eEnSC decidualizadas (Figura 25), llevamos a cabo la cuantificación de la migración de todas las líneas celulares estudiadas (mEnSC, BEnSC, eBEnSC y eEnSC) tras el co-cultivo con dichos medios condicionados (Figura 27).

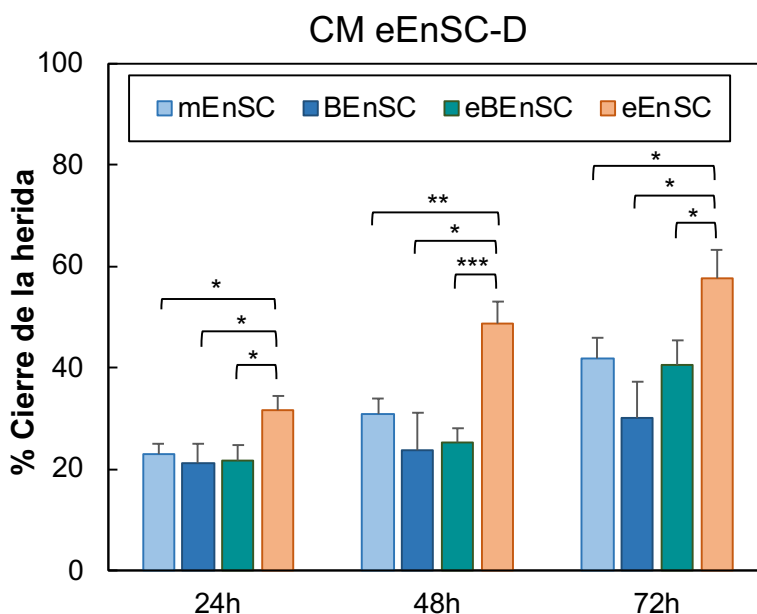


Figura 27. Comparación de la migración de mEnSC, BEnSC, eBEnSC y eEnSC cultivadas con medio condicionado de eEnSC decidualizadas. Las barras representan el porcentaje de cierre de la herida a 24, 48 y 72 horas tras la incubación con medios condicionados de eEnSC decidualizadas (CM eEnSC-D). Las barras de error muestran la SEM de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares.

De este modo confirmamos que la migración de las eEnSC era significativamente mayor que la del resto de líneas celulares cuando se incubaban con los CM procedentes de células endometriósicas decidualizadas, a todos los tiempos analizados.

En resumen:

- La migración de todas las líneas celulares fue similar cuando se incubaron con los CM-U y con el Optimem.
- Los CM-D tuvieron un efecto inhibitor de la migración.
- El efecto inhibitor de la migración de los CM de mEnSC-D fue mayor que el efecto inhibitor de los CM de eEnSC-D.
- La migración de las eEnSC fue significativamente mayor que la del resto de líneas celulares cuando se incubaron con el CM de eEnSC-D.

Por otro lado, aunque el ensayo de cierre de la herida es un método in vitro común para estudiar la migración/invasión celular, después de 72 horas, cabría pensar que, en los casos en que hay un cierre mayor o absoluto de la herida, este podría deberse simplemente a que las células han proliferado más, y no a diferencias en la migración, de modo que los diferentes efectos observados podrían deberse en parte a esta proliferación.

Para comprobar que el ensayo realizado era correcto y los efectos descritos se debían exclusivamente a la capacidad de migración de las células y no a su capacidad proliferativa, se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular con el reactivo Resazurin. Los resultados obtenidos en este ensayo de proliferación tras 72 horas de incubación de las mEnSC y las eEnSC con los distintos CM-U y CM-D demostraron, como se observa en la figura 28, que la capacidad proliferativa de estas células

no se veía afectada por la incubación con los diferentes medios condicionados. De este modo confirmamos que las diferencias encontradas tras realizar el ensayo de cierre de la herida (Figuras 23-26) se debían realmente a diferencias en la capacidad de migración de las distintas líneas celulares y a los efectos sobre la migración de los distintos medios condicionados.

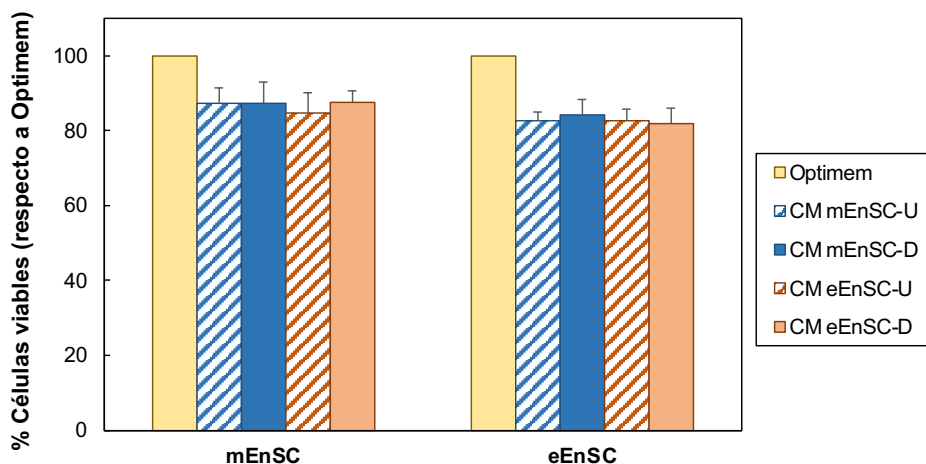


Figura 28. Efecto de los medios condicionados de mEnSC y eEnSC deciduizadas y no deciduizadas sobre la proliferación celular. Comparación del porcentaje de células (mEnSC y eEnSC) viables existentes tras 72h de incubación con los diferentes CM de mEnSC y eEnSC deciduizadas (D) y no deciduizadas (U), respecto al control con Optimem, determinado mediante ensayo colorimétrico con Resazurin.

Finalmente, para establecer si el efecto inhibitor de la migración que observamos en los CM de células deciduizadas era específico para células endometriales o por el contrario dichos CM pueden contener algún tipo de factor capaz de ejercer un efecto generalizado de inhibición de la migración, llevamos a cabo un ensayo de cierre de la herida con células Cal33, una línea de carcinoma oral de células escamosas. Como se observa en la figura 29, el perfil de migración de las células Cal33 tras 24 y 48 horas de incubación con los diferentes CM de células

decidualizadas y no decidualizadas es similar al observado previamente para las diferentes líneas de células endometriales, encontrando igualmente un efecto inhibitor de la migración cuando las células son incubadas con CM de mEnSC y eEnSC decidualizadas y siendo de nuevo el efecto inhibitor del CM eEnSC-D (figura 28, barras naranjas) menor que el del CM mEnSC-D (figura 28, barras azules).

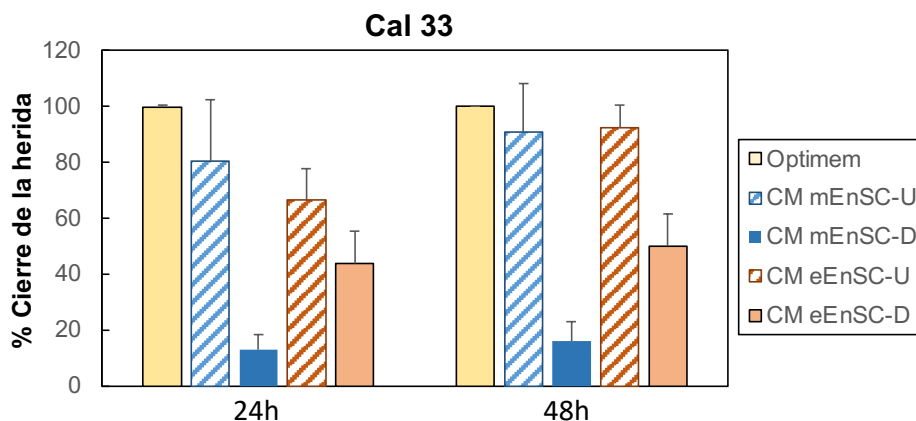


Figura 29. Efecto de los medios condicionados de mEnSC y eEnSC no diferenciadas y decidualizadas sobre la migración de células Cal33. En las gráficas se representa la migración de la línea de células de cáncer de cabeza y cuello, Cal33, estudiada mediante el ensayo de cierre de la herida, tras incubación durante 24 y 48 con medio Optimem, como control, y los CM de mEnSC y eEnSC decidualizadas (CM -D) y no decidualizadas (CM -U). El cierre de la herida se representa como el porcentaje de área cubierta con respecto al momento 0. Las barras de error muestran la SEM de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares.



DISCUSIÓN

Hoy en día, conocer el mecanismo exacto de la patogenia de la endometriosis sigue resultando un desafío. Aunque se han propuesto varias teorías para explicar el origen de la endometriosis^{xcviii xcix} y una amplia variedad de factores, tanto genéticos como epigenéticos, inmunológicos, hormonales y ambientales han sido involucrados en el inicio de la enfermedad^{c ci cii}, aún no está claro si las alteraciones encontradas en las células endometriósicas son intrínsecas a ellas mismas o inducidas por su ubicación ectópica^{ciii}.

La resistencia a la progesterona es una de las principales características del tejido endometriósico. En el presente estudio, por primera vez hasta donde sabemos, se ha comparado la respuesta a la decidualización con P4 y AMPc en EnSC ectópicas (eEnSC) y eutópicas de tres fuentes diferentes y hemos demostrado que, en pacientes con endometriosis, las EnSC ectópicas (eEnSC) son más resistentes a los cambios inducidos por la decidualización que las EnSC eutópicas (eBEnSC).

Recientemente hemos descrito que las EnSC de la sangre menstrual de pacientes sin endometriosis (mEnSC) sufren cambios en su morfología celular, su mecanismo de apoptosis y su secreción de PRL durante la decidualización, aunque en menor medida que las células deciduales estromales (DSC)^{lxxxix}.

Así mismo, hemos observado una respuesta similar para las EnSC obtenidas de biopsia endometrial de mujeres sanas (BEnSC), lo que confirma la equivalencia de ambas fuentes de células endometriales, sangre menstrual y biopsia endometrial.

En consonancia con estudios anteriores que comparan la capacidad de decidualización de las eEnSC con la de las EnSC de donantes sanas^{xcvii}^{civ}, también encontramos que las eEnSC, en su mayoría, conservaron su

morfología fibroblástica y apenas produjeron PRL en respuesta al tratamiento con P4 y cAMP. Además, demostramos que las eEnSC no sufrieron apoptosis, incluso después de una incubación prolongada con P4 y cAMP, a diferencia de las células eutópicas de donantes sanas. Como dato muy relevante, no se observó tampoco apoptosis en EnSC obtenidas del endometrio eutópico de pacientes con endometriosis (eBEnSC), a pesar de que estas células sí que cambiaron significativamente su morfología a una forma más redondeada, y produjeron PRL tras la decidualización, lo que sugiere una respuesta parcial a este proceso por parte de las células eutópicas en pacientes con endometriosis.

Klemmt y cols. habían descrito previamente cambios morfológicos similares a los que observamos, pero una secreción reducida de PRL, en cultivos de células endometriales estromales eutópicas de mujeres con endometriosis, en comparación con células también eutópicas de mujeres sanas después de la decidualización *in vitro*^{cv}. Además, aunque no se cuantificaron, encontraron células poligonales/redondeadas en cultivos de células estromales endometrióticas decidualizadas, siendo su capacidad para secretar PRL significativamente menor que la de las células eutópicas. Las discrepancias con nuestros resultados pueden deberse a las diferentes condiciones experimentales, ya que en este estudio las células se decidularon solo con AMPc^c, mientras que nosotros utilizamos el protocolo estándar para la decidualización con P4 y AMPc^{cv}. Además, hay que destacar que, en nuestro grupo de investigación, el cultivo de estas células endometriales estromales tanto eutópicas como ectópicas se realiza en un medio de cultivo al que sólo hemos añadido un 3% de suero bovino fetal (FBS), a diferencia de los otros grupos los cuales añaden un 10% de FBS. Esta alta concentración de FBS puede dar lugar a que estas células se diferencien obteniendo diferentes resultados a los presentados en este trabajo.

De acuerdo con nuestros resultados y el papel de P4 en la regulación de la producción de PRL, otros autores han demostrado que las células eutópicas de mujeres con y sin endometriosis producen niveles similares de PRL en respuesta a P4, pero no a AMPc^{cvii}.

En cuanto a la resistencia a la apoptosis, clásicamente se ha considerado una característica propia de las células endometriósicas, y diferentes autores han demostrado que la apoptosis espontánea en las células endometriósicas es menor que la de las células del endometrio eutópico en las propias pacientes con endometriosis y esta, a su vez, menor que la del tejido endometrial de mujeres sin endometriosis^{cviii cix cx}.

Este resultado extrapolado a la nomenclatura que empleamos en nuestro estudio equivaldría a que la apoptosis es en:

$$eEnSC < eBEnSC < mEnSC/BEnSC$$

En nuestro estudio hallamos que las eBEnSC se asemejan a las eEnSC en la resistencia a la inducción de la apoptosis durante la decidualización, lo cual está de acuerdo con estudios que han demostrado una expresión alterada de genes antiapoptóticos y proapoptóticos en las células endometriales eutópicas de mujeres con endometriosis^{cxii}.

En particular, se ha demostrado que los genes antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-XL aumentan en el endometrio proliferativo y secretor temprano de pacientes con endometriosis, en comparación con mujeres sin enfermedad^{lxiii cxii cxiii cxiv}, y a su vez se han descrito niveles reducidos de los genes proapoptóticos p53 y caspasa-1 en dicho endometrio eutópico de pacientes con endometriosis^{cxii}. Es decir, en el endometrio de pacientes con endometriosis hay un aumento de expresión de genes antiapoptóticos y una reducción de los genes proapoptóticos, lo que va

a desembocar en una regulación a la baja de la apoptosis, al igual que ocurre en los endometriomas.

Además, las familias de ARNm involucradas en la regulación del ciclo y la muerte celular también están reguladas a la baja en el endometrio de mujeres con endometriosis, como la familia mR-9, uno de cuyos objetivos es el antiapoptótico Bcl-2^{cxiii}.

En conjunto, estos estudios proporcionan una base para respaldar los resultados observados en nuestro estudio en cuanto a la resistencia a la apoptosis inducida por la deciduización, no solo en las eEnSC sino también en las eBEnSCs.

El estudio comparativo del fenotipo antigénico de los cuatro tipos de líneas celulares reveló un perfil similar sin diferencias sustanciales entre las células derivadas de endometrio ectópico (eEnSCs) y eutópico, ya sea de pacientes (eBEnSCs) o de mujeres sanas (BEnSCs/mEnSC).

Nuestros resultados refuerzan datos previos que muestran una expresión similar de marcadores propios de células madre mesenquimales (MSC) en células madre endometriales obtenidas tanto de tejidos endometriales ectópicos como de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis^{cxv} o donantes sanas^{cxvi cxvii}.

Solo encontramos diferencias significativas en el fenotipo de las mEnSCs, con una mayor expresión de CD140b, podoplanina y SUSD-2, marcadores propios de MSC. Esta mayor expresión general de marcadores de MSC en las mEnSC^{cxviii cxix} refuerza la hipótesis de que la sangre menstrual es más adecuada que la biopsia endometrial como fuente para obtener MSC indiferenciadas; lo cual, junto a su ya descrita accesibilidad, hace que sea una fuente celular prometedora para enfoques terapéuticos^{cviii}.

En relación a los cambios en el fenotipo en respuesta a la decidualización, se ha publicado recientemente que las células deciduales estromales (DSC) reducen la expresión de varios marcadores de pericitos y MSC como CD140b, CD146, α -SM actina y SUSD2^{xcii}, un cambio probablemente relacionado con la ubicación y variaciones funcionales de estas células durante la decidualización. Del mismo modo, cuando se llevó a cabo la decidualización de las mEnSCs, se apreció una reducción significativa de la expresión de CD140b y α -SM actina y una disminución leve, aunque en este caso no significativa, del porcentaje de células positivas para CD146 y SUSD2. Estas diferencias entre DSC y mEnSC pueden deberse a la diferente capacidad de ambos tipos de células para responder al proceso de decidualización^{lxxxix}.

Curiosamente, la expresión de los antígenos previamente mencionados no varió significativamente tras la decidualización en el resto de líneas celulares, aunque cabe destacar que en las BEnSC todos estos marcadores mostraron una tendencia no significativa a la baja.

La diferente respuesta a la decidualización hallada entre mEnSC y BEnSC, aunque provienen del mismo origen, podría explicarse sobre la base del estado más indiferenciado que, como se ha sugerido previamente, presentan las mEnSC.

El único marcador de MSC que se reguló en todas las líneas celulares, excepto en las derivadas de tejido ectópico (eEnSC), fue CD105. La endoglina o CD105 es una glicoproteína transmembrana que juega un papel esencial en la angiogénesis^{cxx}. Se ha demostrado que su expresión es inversamente proporcional al grado de diferenciación de las MSC derivadas de la sangre del cordón umbilical (UCB-MSC), por lo que se propuso como un marcador del estado de diferenciación de estas células en el que, a menor expresión de CD105, mayor es el grado de diferenciación de las UCB-MSC^{cxxi}. Nuestros resultados mostraron que

los cuatro tipos de líneas celulares presentaron un perfil de expresión de CD105 heterogéneo en su estado indiferenciado y, de manera similar a las UCB-MSc, se observó una disminución en su expresión en mEnSC, BEnSC y eEnSC tras la diferenciación con P4 y AMPc. Por el contrario, y de acuerdo a su ya descrita resistencia a la decidualización, el nivel de CD105 no cambió en las eEnSC en respuesta al tratamiento con factores decidualizantes.

La capacidad de las EnSC para migrar es una de las funciones celulares habitualmente alteradas durante la decidualización. Diferentes autores han descrito que la decidualización de células endometriales *in vitro* con P4 y AMPc induce una intensa disminución en la motilidad basal de estas células^{xcvi xcvii cxxii}. Por otro lado, las MSC endometriales ectópicas de mujeres con endometriosis han mostrado una mayor capacidad de migración que las MSC eutópicas, ya sea de pacientes con endometriosis o de mujeres sanas^{cxv cxxvii} y mantuvieron esta capacidad tras la decidualización^{xcvii}.

Dado que las células decidualizadas adquieren un fenotipo secretor, hemos abordado el estudio de los cambios en la motilidad en respuesta a la decidualización desde una perspectiva diferente, tratando de examinar si las células decidualizadas podrían secretar factores que puedan reducir su propia motilidad, en lugar de que sean las células decidualizadas las que pierdan su capacidad celular intrínseca de migrar. Es decir, valorar si los responsables del defecto de migración son los factores que produce la célula en lugar de ser cambios sufridos en la propia célula.

La accesibilidad y facilidad de obtención de la muestra en el caso de las mEnSC sin precisar de una intervención quirúrgica y la equivalencia

demostrada con las BEnSC, además de su similitud con los quistes de chocolate de los endometriomas, hace que en nuestro estudio hayamos optado por realizar experimentos como el de migración celular centrándonos en las mEnSC como grupo representativo de donantes sanas.

Ciertamente, nuestros resultados demuestran que las mEnSC, así como las eEnSCs, redujeron su motilidad cuando se incubaron con el medio condicionado de mEnSCs decidualizadas. Esto confirma la hipótesis de que, durante la decidualización, las EnSCs pueden producir algunos factores capaces de inhibir la migración. Dado el impacto e importancia que tiene la motilidad de las EnSC en la remodelación del tejido endometrial durante la regeneración cíclica endometrial y para la implantación del embrión, no sorprende que este proceso esté altamente regulado y que las propias EnSC decidualizadas produzcan factores que contribuyan a su regulación. Los productos específicos y el mecanismo que media este efecto aún no se han determinado.

En este sentido, recientemente se ha publicado que la secreción de decorina, un pequeño proteoglicano rico en leucina que interactúa con el factor de crecimiento transformante (TGF)- β entre muchas otras moléculas, aumenta durante la decidualización y se requiere para la adquisición del fenotipo decidual^{cxixiii}. Además, la decorina reprime la migración e invasión del trofoblasto^{cxixiii}. Sería interesante estudiar si esta proteína también puede restringir la motilidad de las células endometriales.

Teniendo en cuenta la ya conocida mala respuesta de las EnSC ectópicas (eEnSC) a la decidualización, no sorprende que estas células mostraran una menor capacidad para producir esos factores reguladores de la motilidad al decidualizarse, respaldándose esta aseveración en cómo la migración tanto de mEnSC como de eEnSC fue significativamente mayor

después de la incubación con el medio condicionado de eEnSC decidualizadas (con presencia de menos factores inhibidores de motilidad) que cuando se incubaron con CM de mEnSC decidualizadas (células productoras de más factores inhibidores de la motilidad al decidualizarse).

La producción de factores inhibidores de la migración por parte de las células endometriales decidualizadas y las diferencias en la capacidad de las mEnSC y eEnSC decidualizadas para producir dichos factores se confirmaron al analizar la migración de las células de endometrio eutópico de pacientes y donantes sanas, eBEnSC y BEnSC, en presencia de los CM de mEnSC y eEnSC decidualizadas y no diferenciadas. Igualmente, hemos podido confirmar que dichos factores inhibidores no parecen ser específicos para regular la motilidad de células endometriales ya que también impiden la migración de células tumorales, como hemos podido demostrar con la línea de células escamosas de carcinoma oral Cal33.

En cuanto a las potenciales diferencias en la capacidad de migración de células ectópicas y eutópicas, solo se pudieron apreciar en respuesta a la incubación con CM de eEnSCs decidualizadas, es decir, en un contexto en el que hay una inhibición parcial o reducida de la migración. Es razonable especular que la mayor capacidad de migración de las células ectópicas sólo puede apreciarse en aquellas condiciones en las que la motilidad es limitada, mientras que en situaciones de fuerte inhibición (como cuando empleamos CM de mEnSC decidualizadas) o, por el contrario, óptimas para la migración (con uso de medio OptiMEM o con medios condicionados de células no diferenciadas), las diferencias no son evidentes.

Es decir, podríamos establecer tres ambientes:

- Un ambiente muy inhibitor de la migración (CM de mEnSC-D), en el que la migración de todos los tipos celulares se ve anulada.
- Un ambiente que favorece la migración (Optimem y CM-U) de todos los grupos celulares.
- Un ambiente inhibitor moderado (CM de eEnSC-D) debido a la secreción de pocos factores inhibitor de la migración tras el tratamiento con P4 y AMPc de estas células poco sensibles a la decidualización. Es en estas circunstancias en donde se pueden apreciar diferencias entre los tres grupos de células endometriales eutópicas y el grupo de ectópicas, siendo estas, las ectópicas (eEnSC), las que van a tener mayor capacidad migratoria.

Nuestro grupo es, hasta la fecha, el único que ha trabajado y comparado estos cuatro grupos celulares de forma simultánea. Se decidió el empleo como fuente celular de células endometriales de localización ectópica las procedentes del endometrioma porque nos pareció la célula más pura y característica de endometriosis. En estas muestras hemos observado que el crecimiento celular in vitro parece correlacionarse con la edad y la existencia de clínica de dolor en las donantes, existiendo mayor crecimiento a mayor edad y mayor clínica de dolor, lo cual invita a pensar que pueda deberse a una mayor actividad de la endometriosis en estas pacientes, basándonos en que ya ha sido demostrado que son pacientes en las que la gravedad de su endometriosis, en términos de estadiaje y necesidad de cirugía, es significativamente superior^{cxxiv}.

Para futuros trabajos será de interés el empleo y comparación de otras localizaciones de endometriosis como pueden ser el peritoneo o el tejido recto-vaginal, que presentan no solo unas características macroscópicas diferentes al endometrioma clásico, sino también una clínica más severa



y una menor respuesta al tratamiento, lo cual puede arrojar resultados de gran interés en la línea de nuestro estudio.

Como conclusión podemos decir que este estudio demuestra que las células endometriales eutópicas de mujeres con endometriosis pueden presentar alteraciones en algunos fenómenos asociados a la decidualización, como la inducción de apoptosis. Sin embargo, las células ectópicas deben sufrir cambios adicionales en los focos endometriósicos, probablemente derivados de su interacción con el microambiente en la ubicación ectópica, que contribuyen a la adquisición de su alta resistencia a la decidualización.

Las líneas de trabajo que nos planteamos en el futuro se enfocan en confirmar estos resultados con un mayor tamaño muestral; así como tratar de establecer, en la misma paciente con endometriosis, diferencias entre todas las posibles localizaciones de las células endometriales estromales: eutópica y ectópica de origen distinto al endometrioma de forma exclusiva.

El objetivo final es el conocimiento exhaustivo de la fisiopatogenia de una enfermedad que continúa manteniendo una serie de enigmas en su origen, cuya resolución podría contribuir al desarrollo de métodos diagnósticos y herramientas terapéuticas más eficaces.



CONCLUSIONES



- La edad y la existencia de clínica de dolor en las donantes con endometriosis parece relacionarse con el crecimiento celular in vitro.
- Las células endometriales estromales de localización eutópica y ectópica presentan un fenotipo antigénico similar, con marcadores típicos de MSC.
- Las células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual presentan una mayor expresión de algunos marcadores típicos de MSC y una reducción significativa de CD140b, α -SM actina y CD105, en respuesta a la decidualización.
- Las células endometriales ectópicas no secretan prolactina ni alteran su morfología ni su fenotipo en respuesta a la decidualización, a diferencia de las células de endometrio eutópico de donantes sanas y de pacientes con endometriosis.
- Las células endometriales estromales ectópicas y eutópicas de pacientes con endometriosis son resistentes a la inducción de apoptosis durante la decidualización in vitro con progesterona y AMPc.
- Las células endometriales estromales decidualizadas secretan factores inhibidores de la migración para las propias células endometriales, con independencia de su origen, y para células tumorales, siendo menor la capacidad de las células ectópicas para la secreción de dichos factores.
- Las células endometriales estromales ectópicas manifiestan mayor capacidad de migración en condiciones en que la motilidad se encuentra parcialmente limitada.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

BIBLIOGRAFÍA

-
- ⁱ Mehedintu C, Plotogea MN, Ionescu S, Antonovici M. Endometriosis still a challenge. *J Med Life*. 2014; 7(3): 349-57.
- ⁱⁱ Flores I, Rivera E, Ruiz LA. Molecular profiling of experimental endometriosis identified gene expression patterns in common with human disease. *Fertil Steril*. 2007; 87: 1180-99.
- ⁱⁱⁱ Signorile PG, Baldi A. Endometriosis: New concepts in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42: 778-80.
- ^{iv} Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1927;14: 422-69.
- ^v Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004; 18(2):177-200.
- ^{vi} Oosterlynck DJ, Vandepute M, CornilleFJ. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decrease cytotoxicity to autologous endometrium. 1991; 56: 45-51.
- ^{vii} Gruppo Italiano per lo studio dell'endometriosi. Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. *Hum Reprod*. 1994; 9: 1158-62.
- ^{viii} Neme RM, Andrade DC, Brescia M. Epidemiological study on risk factors of pelvic endometriosis in Brazil. *Fertil Steril*. 2002; 77: 537.
- ^{ix} Cates W, Farley TMM, Rowe PJ. Worldwide patterns of infertility: Is Africa different? *Lancet*. 1985; II: 596-8.
- ^x Gruppo Italiano Studio Endometriosi & Parazzini F. Risk factors for pelvic endometriosis in women with pelvic pain or infertility. *Eur J Obstet, Gynecol Reprod Biol*. 1999; 83: 195-9.
- ^{xi} Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009; 360: 268-79.
- ^{xii} Mitchell AO, Hoffman AP, Swartz SE. An unusual occurrence of endometriosis in the right groin: a case report and review of the literature. *Mil Med*. 1991; 156: 633-8.
- ^{xiii} Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012; 98 (3): 511-9.

-
- xiv Gargett CE, Schwab KE, Brosens JJ, Puttemans P, Benagiano G, Brosens I. Potential role of endometrial stem/ progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20 (7): 591-8.
- xv Russell W. Aberrant portions of the mullerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of mullerian origin. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1899; 10:8.
- xvi Fraga MF, Ballestar E, Paz MF. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 10604-9.
- xvii Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18(2): 219-32.
- xviii Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod.* 1998 13(12): 3496-502.
- xix Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V, et al. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet.* 2005; 77(3): 365-76.
- xx Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, Mcgregor S, Lin J, Lee SH, et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet.* 43(1): 51-4.
- xxi Zondervan KT, Weeks DE, Colman R. Familial aggregation of endometriosis in a large pedigree of rhesus macaques. *Hum Reprod.* 2004;19:448-55.
- xxii Xue Q, Lin Z, Yin P, Milad MP, Cheng YH, Confino E, et al. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(8): 3261-7.
- xxiii Artia GR, Zeitoun K, Edwards D. Progesterone receptor isoform A but not B expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 28-37.
- xxiv Gurates B, Bulun SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Semin Reprod Med.* 2003; 21: 125-30.
- xxv Mehedintu C, Plotogea MN, Ionescu S, Antonovici M. Endometriosis still a challenge. *J Med Life.* 2014; 7(3): 349-57.
- xxvi Szylo K, Tchorewski H, Banasik M, Glowacka E, Lewkowicz P, Kamber-Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm.* 2003; 12(3): 131-8.

- xxvii Braun DP, Muriana A, Gebel H. Monocyte-mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1994; 61: 78.
- xxviii Ho HN, Chao KH, Chen HF. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod*. 1995; 10: 2671-8.
- xxix Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1993; 82: 206-14.
- xxx Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res*. 2005; 65: 10139-44.
- xxxii Barrier BF, Kendall BS, Ryan CE, Sharpe-Timms KL. HLA-G is expressed by the glandular epithelium of peritoneal endometriosis but not in eutopic endometrium. *Hum Reprod*. 2006; 21: 864-9.
- xxxiii Mori H, Sawairi M, Nakagawa M. Peritoneal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease. *Am J Reprod Immunol*. 1991; 26:62-8.
- xxxiiii Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod*. 2002; 17:426-30.
- xxxv Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. *Williams ginecología*. 1ªed. McGraw-Hill Companies. 2009.
- xxxvi Matarese G, De Placido G, Nikas Y, Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med*. 2003; 9: 223-8.
- xxxvii Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis, *Fertil Steril*. 1997; 67(5): 817-21.
- xxxviii Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, et al. The Enzian classification: A comprehensive non-invasive and surgical description system for endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2021; 100(7): 1165-75.
- xxxix Puerta-Sanabria JM, Clavero A, Gonzalvo MC, López-Regalado ML, Romero B, Castilla JA, et al. Tasa acumulada de nacido vivo en pacientes con endometriosis. *MEDRE*. 2016; 3:144-51.

-
- xxxix Ghai V, Jan H, Shakir F, Haines P, Kent A. Diagnostic delay for superficial and deep endometriosis in the United Kingdom. *J Obstet Gynaecol.* 2020; 40: 83-9.
- xi Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2014; 29: 400-12.
- xlii Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005; 20: 2698-704.
- xliii Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, Abbiati A, Barbara G, Fedele L. Chronic pelvic pain in women: etiology, pathogenesis and diagnostic approach. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 2009; 25(3): 149-58.
- xliv Riazi H, Tehranian N, Ziaei S, Mohammadi E, Hajizadeh E, Montazeri A. Clinical diagnosis of pelvic endometriosis: a scoping review. *BMC Womens Health.* 2015; 15:39.
- xliv Nnoaham KE, Hummelshoj L, Kennedy SH, Jenkinson C, Zondervan KT, World Endometriosis Research Foundation women's Health Symptom Survey Consortium. Developing symptom-based predictive models of endometriosis as a clinical screening tool: results from a multicenter study. *Fertil Steril.* 2012; 98(3): 692-701.
- xlv World Health Organization. Medical eligibility criteria for contraceptive use, fifth edition. 2015. Full text and executive summary.
- xlvi Jain J, Jakimiuk AJ, Bode FR, Ross D, Kaunitz AM. Contraceptive efficacy and safety of DMPA-SC. *Contraception.* 2004; 70: 269-75.
- xlvii Rottenstreich M, Drukker L, Reichman O, Kedem R, Rottenstreich A, Sela HY. Adherence to no-cost oral contraceptives among active-duty servicewomen. *BMJ Sex Reprod Health.* 2019; 45: 104-10.
- xlviii Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2014; 101: 927.
- xlix Duffy JM, Arambage K, Correa FJ, Olive D, Farguhar C, Garry R, et al. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; (4): CD011031.

-
- ⁱ Shakiba K, Bena JF, McGill KM, Minger J, Falcone T. Surgical treatment of endometriosis: a 7-year follow-up on the requirement for further surgery. *Obstet Gynecol.* 2008; 111(6): 1285-92.
- ⁱⁱ Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008, Issue 2. Art. No.: CD004992.
- ⁱⁱⁱ Carmona F, Martínez-Zamora MA, Rabanal A, Martínez-Román S, Balasch J. Ovarian cystectomy versus laser vaporization in the treatment of ovarian endometriomas: a randomized clinical trial with a five-year follow-up. *Fertil Steril.* 2011; 96(1): 251-4.
- ⁱⁱⁱⁱ Fanfani F, Fagotti A, Gagliardi ML, Ruffo G, Ceccaroni M, Scambia G, et al. Discoid or segmental resectosigmoid resection for deep infiltrating endometriosis: a case-control study. *Fertil Steril.* 2010; 94(2): 444-9.
- ^{liv} De Cicco C, Corona R, Schonman R, Mailova K, Ussia A, Koninckx P. Bowel resection for Deep endometriosis: a systematic review. *BJOG.* 2011; 118(3): 285-91.
- ^{lv} Thijs I, Bhal PS, Shaw R, Kynaston H. Isolated vesical endometriosis in the absence of previous surgery. *J Obstet Gynaecol.* 2002. 22(4) 448-9.
- ^{lvi} Becker CM, Bokor A, Heikinheimo O, Horne A, Jansen F, Kiesel L. ESHRE guideline: endometriosis. *Hum Reprod Open.* 2022.
- ^{lvii} Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Berlanda N, Borruto F, Frontino G. Tailoring radicality in demolitive surgery for deeply infiltrating endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(1):114-7.
- ^{lviii} Wide-With and I N Tissue Kinetics. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide."
- ^{lix} Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. *Cell Death: The Significance of Apoptosis.* 1980. Vol 68.
- ^{lx} Boeddeker SJ, Hess, AP. *The Role of Apoptosis in Human Embryo Implantation.* *J Reprod Immunol.* 2015. Elsevier Ireland Ltd: 114–22.
- ^{lxi} Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2004; 10: 29-38.
- ^{lxii} Béliard A, Noël A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril.* 2004; 82: 80-5.

-
- lxiii Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2000; 74: 760-6.
- lxiv Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and Bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*. 1998; 13, 3496-502.
- lxv Garcia-Velasco JA, Mulayim N, Kayisli UA, Arici A. Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2002; 78: 855-9.
- lxvi Campbell IG, Thomas EJ. Endometriosis: candidate genes. *Hum Reprod Update*. 2001; 7: 15-20.
- lxvii Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol*. 2003; 22: 51-60.
- lxviii Leno-Durán E, Ruiz-Magán MJ, Muñoz-Fernandez R, Requena F, Olivares EG, Ruiz-Ruiz C. Human decidual stromal cells secrete soluble pro-apoptotic factors during decidualization in a cAMP dependent manner. *Hum Reprod*. 2014; 19 (10): 2269-77.
- lxix Ha Z, Hou CC, Luo LF, Hu YJ, Yang WX. Endometrial Stromal Cells and Decidualized Stromal Cells: Origins, Transformation and Functions. *Gene*. 2014; 551 (1): 1-14.
- lxx Montes MJ, Alemán P, Tortosa CG, Borja C, Ruiz C, Olivares EG. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol*. 1996; 30: 53-66.
- lxxi Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod*. 1997; 57: 609-15.
- lxxii Kimatrai M, Oliver C, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2003; 88: 844-9.
- lxxiii Kimatrai M, Blanco O, Muñoz-Fernandez R, Tirado I, Martin F, Abadia-Molina AC, et al. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 6126-30.
- lxxiv Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, Chemokines

and Growth Factors in Endometrium Related to Implantation. *Hum Reprod.* 2005; 11 (6): 613-30.

lxxv Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011; 20(1): 5-14.

lxxvi García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. 2001; *Mol Hum Reprod* 7: 151-7.

lxxvii Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod.* 2007; 22: 2903-11.

lxxviii Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA.* 2004; 292: 81-5.

lxxix Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells.* 2007; 25: 2082-6.

lxxx Chan RWS, Gargett CE. Identification of Label-Retaining Cells in Mouse Endometrium. *Stem Cells.* 2006; 24: 1529-38.

lxxxi Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J Transl Med.* 2007; 5: 57-66.

lxxxii Osteen KG, Bruner-Tran KL, Eisenberg E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertil Steril.* 2005; 83, 529- 37.

lxxxiii Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, et al. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinol.* 2007; 148, 3814-26.

lxxxiv Eyster KM, Klinkova O, Kennedy V, Hansen KA. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril.* 2007; 88, 1505-33.

lxxxv Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol.* 2009; 23, 265-75.

lxxxvi Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update.* 2010; 16, 142-65.

lxxxvii Becker CM, Bokor A, Heikinheimo O, Horne A, Jansen F, Kiesel L et al. ESHRE guideline: endometriosis. *Hum Reprod Open*. 2022; 26 (2).

lxxxviii Garcia-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod*. 2001; 7: 1151-7.

lxxxix Ruiz-Magana MJ, Martinez-Aguilar R, Llorca T, Abadia-Molina, AC, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG. Decidualization modulates the mesenchymal stromal/stem cell and pericyte characteristics of human decidual stromal cells. Effects on antigen expression, chemotactic activity on monocytes and antitumoral activity. *J Reprod Immunol*. 2021; 145, 103326.

xc Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem*. 1994; 218, 314-9.

xci Schwab KE, Gargett CE. Co-Expression of Two Perivascular Cell Markers Isolates Mesenchymal Stem-like Cells from Human Endometrium. *Hum Reprod*. 2007. 22 (11): 2903-11.

xcii Ruiz Magana MJ, Puerta JM, Martinez-Aguilar R, Llorca T, Blanco O, Munoz-Fernandez R, et al. Endometrial and decidual stromal precursors show a different decidualization capacity. *Reprod*. 2020; 160: 83-91.

xciii Sumathi VP, McCluggage WG. CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol*. 2002; 55: 391-2.

xciv Leno-Durán E, Ruiz-Magán MJ, Muñoz-Fernandez R, Requena F, Olivares EG, Ruiz-Ruiz C. Human decidual stromal cells secrete soluble pro-apoptotic factors during decidualization in a cAMP dependent manner. *Hum Reprod*. 2014; 19 (10): 2269-77.

xcv Leno-Duran E, Ruiz-Magana MJ, Munoz-Fernandez R, Requena F, Olivares EG, Ruiz-Ruiz C. Human decidual stromal cells secrete soluble pro-apoptotic factors during decidualization in a cAMP-dependent manner. *Hum Reprod*. 2014; 29: 2269-77.

xcvi Lavogina D, Stepanjuk A, Peters M, Samuel K, Kasvandik S, Khatun M, et al. Progesterone triggers Rho kinase-cofilin axis during in vitro and in vivo endometrial decidualization. *Hum Reprod*. 2021; 36: 2230-48.

xcvii Sultana S, Kajihara T, Mizuno Y, Sato T, Oguro T, Kimura M, et al. Overexpression of microRNA-542-3p attenuates the differentiating capacity of endometriotic stromal cells. *Reprod Med Biol.* 2017; 16: 170-8.

xcviii Taylor HS. Bone marrow in the pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2020; 113: 942.

xcix Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Vigano P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4: 9.

c Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S, et al. Endometriosis. *Endocr Rev.* 2019; 40: 1048-79.

ci Symons LK, Miller JE, Kay VR, Marks RM, Liblik K, Koti M, et al. The immunopathophysiology of endometriosis. *Trends Mol Med.* 2018; 24: 748-62.

cii Szukiewicz D, Stangret A, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG, Soritau O, Susman S, et al. Estrogen- and progesterone (P4)-mediated epigenetic modifications of endometrial stromal cells (EnSCs) and/or mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) in the etiopathogenesis of endometriosis. *Stem Cell Rev Rep.* 2021; 17: 1174-93.

ciii McKinnon B, Mueller M, Montgomery G. Progesterone resistance in endometriosis: an acquired property? *Trends Endocrinol Metab.* 2018; 29: 535-48.

civ Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: 35-43.

cv Klemmt PA, Carver JG, Kennedy SH, Koninckx PR, Mardon HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril.* 2006; 85: 564-72.

cvi Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol.* 2003; 178: 357-72.

cvi Aghajanova L, Hamilton A, Kwintkiewicz JV, Giudice LC. Steroidogenic enzyme and key decidualization marker dysregulation in endometrial stromal cells from women with versus without endometriosis. *Biol Reprod.* 2009; 80: 105-14.

cviii Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1998; 69: 1042-7.

^{cix} Imai A, Takagi A, Tamaya T. Gonadotropin- releasing hormone analog repairs reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 2020; 182: 1142-6.

^{cx} Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2020; 74: 760-6.

^{cx}_i Ahn SH, Khalaj K, Young SL, Lessey BA, Koti M, Tayade C. Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. *Fertil Steril.* 2016; 106: 1420-31.

^{cx}_{ii} Braun DP, Ding J, Shaheen F, Willey JC, Rana N, Dmowski WP. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril.* 2007; 87: 263-8.

^{cx}_{iii} Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2009; 15: 625-31.

^{cx}_v Kao AP, Wang KH, Chang CC, Lee JN, Long CY, Chen HS. Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model. *Fertil Steril.* 2011; 95: 1308-15.

^{cx}_{vi} Koippallil Gopalakrishnan Nair AR, Pandit H, Warty N, Madan T. Endometriotic mesenchymal stem cells exhibit a distinct immune phenotype. *Int Immunol.* 2015; 27: 195-204.

^{cx}_{vii} Liu Y, Liang S, Yang F, Sun Y, Niu L, Ren Y, et al. Biological characteristics of endometriotic mesenchymal stem cells isolated from ectopic lesions of patients with endometriosis. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11: 346-7.

^{cx}_{viii} Bozorgmehr M, Gurung S, Darzi S, Nikoo S, Kazemnejad S, Zarnani AH, et al. Endometrial and menstrual blood mesenchymal stem/stromal cells: Biological properties and clinical application. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 497.

^{cx}_{ix} Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod.* 2016; 22: 137-63.

^{cx}_x Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003; 17: 984-92.

^{cxxi} Jin HJ, Park SK, Oh W, Yang YS, Kim SW, Choi SJ. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 381: 676-81.

^{cxxii} Chen C, Li C, Liu W, Guo F, Kou X, Sun S, et al. Estrogen-induced FOS-like 1 regulates matrix metalloproteinase expression and the motility of human endometrial and decidual stromal cells. *J Biol Chem.* 2020; 295: 2248-58.

^{cxxiii} Halari CD, Nandi P, Jeyarajah MJ, Renaud SJ, Lala PK. Decorin production by the human decidua: role in decidual cell maturation. *Mol Hum Reprod.* 2020; 26: 784-96.

^{cxxiv} Conroy I, Mooney SS, Kavanagh S, Duff M, Jakab I, Robertson K, et al. Pelvic pain: what are the symptoms and predictors for surgery, endometriosis and endometriosis severity. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2021; 61(5): 765-72.