

El líquido peritoneal de mujeres con endometriosis promueve la adhesión celular.

Modelo *in vitro*

CÉSAR HERNÁNDEZ-GUERRERO,^{a,b} FELIPE VADILLO ORTEGA,^c
LUIS JIMÉNEZ-ZAMUDIO,^d RUBEN TLAPANCO-BARBA,^e MARCO GONZÁLEZ-JIMÉNEZ,^a
CARLOS RAMOS-PÉREZ,^f JULIO DE LA JARA-DÍAZ^e

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la capacidad de adhesión celular del líquido peritoneal (LP) de mujeres con endometriosis.

Material y métodos: Como matriz de adhesión celular, se emplearon membranas amnióticas en las que se eliminó la capa de células epiteliales, mediante tratamiento con etanol a 70% y congelación. La adhesión celular se determinó empleando células Wish, las cuales fueron marcadas con timidina tritiada (³H). Se adicionaron y mantuvieron en condiciones óptimas de cultivo 3 X 10⁵ células marcadas radiactivamente, sobre explantes de matriz amniótica de 10 mm de diámetro por espacio de 60 minutos, evaluándose la adhesión cada 10 minutos. La adhesión celular se determinó mediante la cuantificación de la marca radiactiva presente en las rodajas. La adhesión mostrada por las células en condición basal inició a partir de 10' de incubación y se mantuvo hasta los 60', con un valor promedio en toda la cinética de alrededor de 5%.

Resultados: Cuando las células fueron colocadas en presencia de líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, se identificó un aumento en la capacidad de adhesión de las células en todos los puntos de la cinética (ANOVA F = 30.0; IC 95%; p < 0.05), en comparación con LP de mujeres testigo, y empleando suero fetal bovino a la misma concentración de proteína.

Conclusiones: Se desarrolló un modelo con el que se puede evaluar la adhesión celular *in vitro*. Con el modelo se evidenció que el LP de mujeres con endometriosis presenta componentes que potencian dicha capacidad.

PALABRAS GUÍA: Endometriosis, adhesión celular, infertilidad, líquido peritoneal.

^a Departamento de Ultramicroscopía; Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

^b Becario CONACYT No: 91993.

^c Dirección de Investigación; INPer.

^d Becario COFAA y EDD; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

^e Departamento de Esterilidad e Infertilidad, INPer.

^f Departamento de Planificación Familiar, INPer.

Correspondencia:

Dr. César A. Hernández Guerrero

Jeje Depto. Ultramicroscopía

Subdirección de Investigación Biomédica, INPer

Piso 3º Torre de Investigación

Montes Urales 800, Col. Lomas de Virreyes, México D.F.

Tel. 55209900-339;

Correo electrónico: hehecatzin@yahoo.com

Recibido: 11 de diciembre de 2002

Aceptado: 20 de diciembre de 2002

INTRODUCCIÓN

La presencia y crecimiento del tejido endometrial fuera de la cavidad uterina se denomina endometriosis. Este tejido se encuentra formado por los mismos elementos que constituyen el tejido eutópico, es decir: glándulas, arterias espirales, células endometriales y estroma.¹ En casi todos los casos es posible observar la funcionalidad del tejido endometrial heterotópico, ya que responde a los cambios hormonales durante el ciclo menstrual.²



Esta patología representa, sin duda, una de las más importantes en salud reproductiva a nivel mundial, pues se informa una prevalencia de 35 a 50% en el grupo de mujeres estériles.³ A la fecha, la etiología que explique el fenómeno se desconoce, sin embargo, la hipótesis propuesta por Sampson⁴ es la más aceptada para entender la presencia de tejido endometrial ectópico: postula que durante la descamación uterina el fluido menstrual, por el contraflujo a través de las tubas, es capaz de alcanzar la cavidad peritoneal y ahí, bajo condiciones específicas, implantarse y proliferar bajo el estímulo hormonal del ciclo ovulatorio. Diversas publicaciones han evidenciado la presencia de restos de componentes menstruales, en un alto porcentaje, en el peritoneo de las mujeres estudiadas, por lo que se presume que el fenómeno de menstruación por contraflujo sea un suceso cotidiano en cada ciclo menstrual.^{5,6} Asimismo, mediante el empleo de modelos animales o cultivo celular *in vitro*, se ha demostrado que las células endometriales obtenidas de la cavidad peritoneal expresan una viabilidad mayor a 50% y que son capaces de implantarse, proliferar y responder a hormonas esteroides.⁷⁻⁹ Amplias evidencias señalan alteraciones en la respuesta inmunológica del microambiente peritoneal, en donde se encuentra una menor capacidad de las células efectoras/moduladoras locales, en comparación con el tejido y las células endometriales que arriban a la cavidad peritoneal en cada ciclo menstrual.¹⁰⁻¹³ La explicación de una disminución en la capacidad de eliminar el tejido endometrial, por parte de las mujeres con endometriosis, relaciona la supervivencia y crecimiento del tejido endometrial en forma ectópica; sin embargo, existen pocas evidencias que aborden las etapas iniciales que prevalecen en el ambiente peritoneal, involucradas en el contacto, adhesión y anclaje de las células con el epitelio peritoneal, para que éstas puedan establecer contacto con la circulación y suplir las demandas meta-bólicas involucradas en su crecimiento.

La implantación del tejido endometrial ectópico en la cavidad peritoneal debe iniciar con el contacto íntimo de las células endome-

triales a tejidos y órganos blanco. A nivel molecular, la interacción que media la adhesión celular está dada por diversas proteínas solubles de la membrana, denominadas en forma genérica: “moléculas de adhesión intercelular”; las cuales funcionan como ligandos y receptores de diferentes componentes de la matriz extracelular, membrana basal y proteínas de superficie de la membrana celular, lo que podría conferir la fuerza de unión necesaria para que la célula quede íntimamente unida, a células o tejido conectivo de órganos y tejido blanco.¹⁴⁻¹⁶

Los mecanismos moleculares involucrados en la implantación ectópica del tejido endometrial se desconocen en su totalidad, sin embargo, las células endometriales que por contraflujo, a través de las trompas, arriban a la cavidad peritoneal y logran implantarse, deben valerse de algún mecanismo de “anclaje”, que promueva tal evento. Se desconoce si las condiciones específicas del ambiente peritoneal de las mujeres que presentan endometriosis, participan en dicho evento.

El presente trabajo desarrolló un modelo con el que es posible cuantificar y evaluar la adhesión celular *in vitro*, e iniciar la exploración de las condiciones que presenta el ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis, involucradas en este fenómeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desarrollo del modelo de adhesión celular *in vitro*

Para desarrollar el modelo de adhesión celular se emplearon membranas amnióticas, a partir de placentas provenientes de partos normales a término, sin complicación alguna, en las que se separó manualmente el *corion* del *amnios*. La membrana amniótica obtenida fue lavada exhaustivamente con solución salina fisiológica con la intención de eliminar en su totalidad el tejido sanguíneo. Posteriormente, se utilizó un sacabocados, para realizar cortes circulares sobre la membrana, obteniéndose rodajas de aproximadamente 10 milímetros (mm) de diámetro. Con la intención de obtener un modelo de adhesión libre de células, que

presente componentes de matriz extracelular, con los que las células en cultivo fueran capaces de interaccionar, se eliminó la capa celular epitelial, mediante la adición de doscientos cincuenta mililitros de etanol al 70%, seguido de congelación a -20°C durante 12 h. Al término del lapso, las rodajas fueron lavadas exhaustivamente con medio de cultivo Dulbecco (DMEM, Gibco, BRL) y almacenadas a 4°C , hasta su empleo.

Cultivo celular

Para validar la capacidad de inducción de adhesión celular, por parte del líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, se empleó la línea de células Wish, proveniente de tejido amniótico humano de la *American Type Culture Collection* (CCL-25). Las células fueron cultivadas en cajas de 75 centímetros cuadrados de superficie, con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, y mantenidas a 37°C con humedad relativa de 80 y 5% de CO_2 . Cuando las células se encontraban a 70% de confluencia (aproximadamente 48 horas antes de realizar el ensayo) éstas se marcaron con un pulso radiactivo de 10 μCi de timidina tritiada (^3H), permitiendo que las células llegaran a la confluencia celular, para llevar a cabo la realización de los experimentos. Una vez ocurrida ésta, las células fueron despegadas de la caja mediante incubación durante tres a cinco minutos, con una solución de tripsina-EDTA. Al término de este lapso, la tripsina se eliminó mediante lavados con medio DMEM, y se ajustó la concentración celular a 10 millones de células por mililitro. En todos los casos se utilizaron aquellas células que mostraron una viabilidad mayor a 90%, analizadas mediante la exclusión del colorante vital azul tripán.

Ensayos de adhesión

La realización de los ensayos de adhesión, se llevaron a cabo utilizando pozos de cultivo individuales de 20 mm de diámetro, los cuales fueron recubiertos con 300 μL de agarosa estéril a 2%, con la intención de eliminar el pegado inespecífico de las células. Las rodajas de *amnios* procesadas, según se describió anteriormente,

se colocaron en el fondo de los pozos y se adicionaron 50 μL de medio DMEM suplementado, con la intención de mantener hidratado el tejido.

El ensayo de adhesión se realizó colocando en los pozos antes descritos 3×10^5 células Wish marcadas radiactivamente, en un volumen final de 220 μL de medio DMEM, y se incubaron a 37°C con ambiente de humedad relativa de 80 y 5% de CO_2 . La cinética de adhesión se realizó dejando las células en interacción con la membrana por un lapso máximo de una hora, obteniéndose muestras por duplicado cada 10 minutos, a partir del momento en que se colocaron. Para determinar el porcentaje de células pegadas a la membrana en la cinética, primero se recuperó en forma completa el medio de cultivo de los pozos, obteniéndose las células no adheridas a la membrana; seguido de esto, se realizaron dos lavados de 220 μL con medio de cultivo, con la intención de eliminar la marca radiactiva liberada por lisis celular remanente. En este paso, el medio de cultivo empleado se mantuvo a 37°C , para evitar que por choque térmico las células adheridas a la membrana pudieran desprenderse. La fracción de células adheridas a la membrana se obtuvo adicionando 220 μL de una solución de NaOH al 0.1 N de concentración final. Seguido de esto, la membrana se recuperó y los pozos se lavaron dos veces con 220 μL de la solución de NaOH, antes descrita. El volumen total recuperado procedente del lavado y pegado de las células se recolectó en tubos de plástico de 1.5 mL, que fueron almacenados a 4°C , hasta realizar el conteo de la radiación presente.

Inducción de adhesión celular empleando líquido peritoneal y plasma sanguíneo periférico

La determinación de inducción de adhesión celular, por parte de líquido peritoneal (LP) y plasma sanguíneo (PS) de mujeres con endometriosis, se llevó a cabo utilizando la cantidad de proteína promedio cuando se coloca el LP o SP a 10% de concentración en relación volumen/volumen. Las muestras de LP y PS de las mujeres con endometriosis se



obtuvieron de la Clínica de Esterilidad del Instituto Nacional de Perinatología. Las muestras de LP y PS del grupo testigo se obtuvieron de la Clínica de Planificación Familiar de mismo Instituto.

Para determinar la capacidad de inducción de adhesión celular se emplearon 3×10^5 células Wish marcadas radiactivamente, se mezclaron con medio de cultivo suplementado con LP o PS, empleando muestras provenientes de mujeres con endometriosis y se colocaron en el sistema de adhesión. Como grupo testigo se empleó LP y PS, provenientes de mujeres sanas fértiles obtenidos de mujeres que asistieron a la clínica de planificación familiar, para que se les practicara obstrucción tubaria bilateral, como método anticonceptivo. Asimismo, el pegado basal de las células se determinó mediante la incubación de las células Wish, con medio de cultivo suplementado a 10% con suero fetal bovino.

Cuantificación de marca radiactiva

A partir de las soluciones colectadas de la cinética de adhesión, correspondiente al lavado y pegado de las células, se tomaron 400 μL y se colocaron en recipientes de 24 pozos del sistema de conteo de radiactividad tipo *beta*, (Top Count, Packard Co.), adicionando 600 μL de líquido de centelleo, contando cada muestra durante un minuto. Los resultados se expresaron como desintegraciones por minuto, y corresponden a la radiactividad incorporada en el material genético de las células, la cual es directamente proporcional al número de células que se encontraban presentes. Para determinar el porcentaje de células presentes en las membranas, se cuantificó la cantidad de marca radiactiva existente en el número de células adicionadas en cada membrana del sistema de adhesión. El valor de desintegraciones por minuto obtenido (dpm) representó el 100% celular, a partir de lo que se determinó el porcentaje de células adheridas en los ensayos.

El protocolo fue sometido a los Comités de Investigación y Ética del INPer, y en todos los casos se solicitó el consentimiento informado de las mujeres para obtener las muestras correspondientes.

RESULTADOS

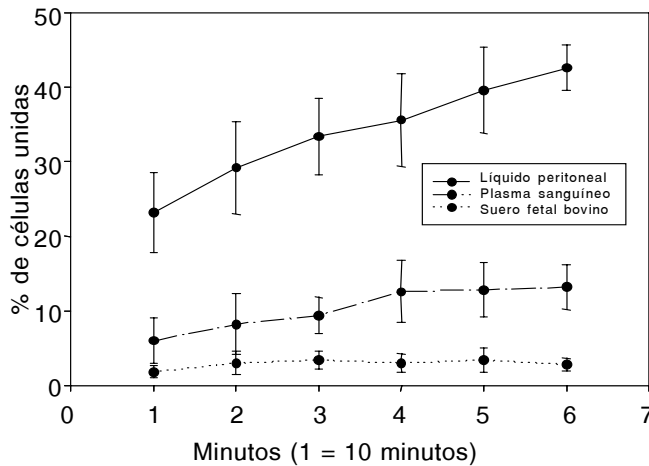
Modelo de adhesión

Se realizaron diversos experimentos de cinética de adhesión de células, las cuales fueron incubadas con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% de concentración en relación volumen a volumen. Se evaluaron diferentes tiempos y concentraciones celulares (datos no mostrados), hasta obtener las condiciones óptimas para llevar a cabo los experimentos del estudio; determinando 60 minutos como tiempo de incubación, y el empleo de 300,000 células Wish marcadas radiactivamente. Se observó que las células inician la adhesión a la membrana amniótica, a partir del momento en que son colocadas en contacto con ella, observando que a los 10 minutos de incubación, ya aparecen células pegadas a la membrana, y que el porcentaje de unión se mantiene constante durante el resto de la incubación, obteniéndose un porcentaje de adhesión celular menor a 5% de adhesión.

Adhesión celular en presencia de líquido peritoneal y sangre periférica

La coincubación de las células en presencia de medio DMEM suplementado, con líquido peritoneal y sangre periférica a 10%, mostraron un patrón de adhesión distinto con referencia al mostrado por las células en forma basal (medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%). Asimismo, se observó diferencia entre el porcentaje de adhesión de las células coincubadas en presencia de líquido peritoneal, con respecto al porcentaje mostrado por las células coincubadas con sangre periférica, al utilizar muestras provenientes de mujeres estériles con presencia videolaparoscópica de endometriosis.

La figura 1 muestra el promedio de cinco experimentos de cinética de adhesión celular, en el que se emplearon líquidos biológicos provenientes de pacientes con endometriosis. En la gráfica se observa como a partir de los 10 minutos de coincubación en presencia de líquido peritoneal, existe una adhesión celular mayor en comparación a las células incubadas

Figura 1**Cinética de adhesión celular en pacientes con endometriosis****Tabla 1****Porcentaje de adhesión celular en el modelo de estudio**

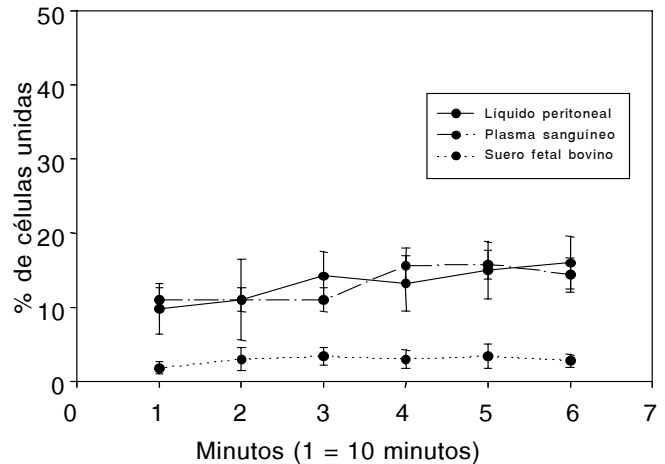
Tiempo (minutos)	% de células adheridas LP	
	Endometriosis (n = 5)	Testigo (n = 5)
10	23 ± 5*	9 ± 3
20	29 ± 6*	11 ± 5
30	33 ± 5*	14 ± 3
40	35 ± 6*	15 ± 3
50	39 ± 5*	16 ± 3
60	42 ± 3*	16 ± 3

Datos en porcentaje promedio de células adheridas $\pm$ desviación estándar.
 Datos comparados con ANOVA $F = 30.0$ (IC 95%); método de Tukey.

* $p < 0.05$; % de células adheridas LP de mujeres con endometriosis versus porcentaje de adhesión LP testigo en el mismo tiempo.

en presencia de LP de mujeres sanas fértiles, y que esta diferencia se mantiene hasta el término de la cinética, observándose diferencia estadística en todos los casos (Tabla 1). Por otro lado, también fue posible observar diferencia estadística entre el LP y SP de las mujeres con endometriosis.

La figura 2 muestra la cinética de adhesión de células coincubadas, en presencia de sangre periférica y líquido peritoneal de mujeres sanas fértiles. En ellas es posible apreciar un patrón de adhesión muy similar entre los fluidos

Figura 2**Cinética de adhesión celular de pacientes sanas**

biológicos, sin que se presenten diferencias estadísticas en la cantidad de células pegadas a la membrana.

DISCUSIÓN

La endometriosis representa una de las patologías más importantes en salud reproductiva, sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares involucrados en el inicio y desarrollo del fenómeno. Diversos grupos han informado en pacientes con endometriosis alteraciones inmunológicas cuantitativas y cualitativas, a nivel del microambiente peritoneal y circulatorio, al compararlas con mujeres sanas fértiles. Los estudios se han centrado en analizar diversas variables inmunológicas analizando valores numéricos y/o funcionales de células y compuestos solubles, sin embargo, poco se ha explorado sobre los mecanismos involucrados en las etapas iniciales del fenómeno, que involucran la adhesión, implantación y crecimiento.

Con el empleo del modelo presentado en este estudio se plantea abordar, en forma directa, los mecanismos que median la adhesión de células y tejido endometrial, simulando lo acontecido en la cavidad peritoneal; ya que el uso de fragmentos de tejido peritoneal con las dimensiones adecuadas para utilizarse con el mismo fin, resulta operativa y éticamente complicado.



Por otro lado, el uso del *amnios* como matriz para la adhesión celular, en sustitución de tejido peritoneal, se fundamenta en la alta similitud que existe entre estos dos tejidos. El peritoneo y la membrana amniótica están constituidos de una capa simple de células epiteliales, en las que se presentan mínimas diferencias citológicas entre ellas. Ambos tejidos expresan proteínas filamentosas intermedias, (citoqueratina 18 y 19) y la composición de los componentes principales de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágena tipo IV, proteoglicanos, y heparán sulfato) son muy similares a nivel de inmunohistoquímica.¹⁷⁻²⁰

Con la intención de estandarizar el funcionamiento del modelo e iniciar la exploración de las condicionantes imperantes en el ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis, se empleó una línea de células epiteliales provenientes de tejido amniótico, que para el propósito de desarrollo y validación, se realizaron experimentos de adhesión de dichas células, incubadas con medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino a 10%, en los que se determinó el número y cantidad de células óptima para llevar a cabo los experimentos. Posteriormente, el modelo se aplicó empleando células cocultivadas en presencia de líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, las cuales mostraron una capacidad de adhesión significativamente diferente, con respecto al presentado por células en presencia del plasma sanguíneo autólogo y de las células en forma basal; característica que no fue observada al emplear el líquido peritoneal de mujeres sanas fértiles, donde no se encontró diferencia alguna con respecto a la inducción de adhesión celular del suero autólogo y células en forma basal. Este hallazgo refuerza una de las características de la patología que señalan la compartimentalización de los eventos involucrados en el ambiente peritoneal. Desconocemos cuáles pueden ser los elementos moleculares presentes en este fluido biológico que participan en la inducción del aumento de la capacidad de adhesión, y si esta condición se encuentra antes de que se inicie el desarrollo de la patología. Aunque

las muestras de LP empleadas para llevar a cabo los experimentos provienen de mujeres con estadios iniciales de la patología (I y II), es muy probable que el ambiente peritoneal sea modificado por la síntesis de compuestos que liberan las células endometriales ectópicas o las células de los tejidos y órganos locales, inducidas por éstas.

A la fecha, se desconoce cuáles de las células del tejido endometrial (del epitelio o del estroma) son las encargadas de iniciar la adhesión celular, a través del contacto de los componentes estructurales de la membrana basal, de la matriz extracelular o de moléculas de superficie de las membranas biológicas, cuando éstas arriban a la cavidad peritoneal. Sin embargo, parece necesario que el peritoneo y los órganos locales blanco presenten alguna alteración (daño celular, inflamación, reparación, etc.), de tal forma que la capa epitelial aumente la expresión de moléculas de adhesión derivado de los mecanismos de reparación, o que se permita la exposición de moléculas del tejido conectivo capaces de mediar la unión de ligandos y receptores entre las células endometriales a órganos y tejidos.²¹ Al respecto, se ha descrito que el ambiente peritoneal de mujeres con endometriosis, desde los primeros estadios de la patología, presenta un mayor estado de proinflamación como causa de la presencia de citocinas (TNF- α , IL1- β , IL6) y especies reactivas de oxígeno liberadas por la activación de células fagocíticas,²²⁻²⁴ que son capaces de condicionar un aumento en la expresión y liberación de moléculas de adhesión (sICAM, fibronectina, etc.) y condicionar un mayor estado de oxidación, el cual puede tener efectos directos sobre las células locales, alterando,²⁵⁻²⁷ dañando o destruyendo a éstas, pudiendo aparecer zonas susceptibles para la adhesión celular del endometrio en forma ectópica.

Dando por hecho que la teoría del trasplante documentalmente es la más aceptada a la fecha para explicar la presencia de endometriosis, la interacción de las células endometriales que por contraflujo arriban al peritoneo, y la superficie celular de los diferentes órganos y tejidos presentes en este ambiente, debe ser

un evento crucial en la determinación del camino que sigue el tejido uterino presente. De existir condiciones “adecuadas”, las células endometriales serán capaces de implantarse y proliferar en forma ectópica, o ser eliminadas mediante elementos efectores de la respuesta inmunológica. Las interacciones que permitan a las células endometriales anclarse a un tejido en forma ectópica, deberán estar mediadas por diversas moléculas de adhesión que,

mediante interacciones célula-célula y/o célula con diferentes componentes de la matriz extracelular, participen como cemento que media tal interacción inicial. El presente estudio propone un modelo capaz de ser empleado en el estudio de adhesión celular e identifica características entre el ambiente peritoneal de mujeres, con y sin endometriosis, que señala la existencia de diferencias relevantes al respecto.

ABSTRACT

Objective: To evaluate adhesion cellular capacity of the peritoneal fluid from women with endometriosis.

Material and methods: Seventy percent ethanol and ice were used to denudated amniotic membrane epithelia cells, from human chorioamnios membranes obtained by delivery at term. Wish (amniotic derivate epithelial cell line) cells were used to assignment cellular adhesion; cells were target with 100 mCi/mmol thymidine (^3H) pulse. Around 3×10^5 target cells were added to a 10 mm amnion explants diameter by 60 minutes, at optimal culture cell conditions, measuring cell adhesion every 10 minutes.

Results: Cell adhesion in an *in vitro* model was determined by beta-radioactive measures at the explants. Basal cellular adhesion start at the first ten minutes until sixty minutes, that shows around 5% media cellular adhesion at every kinetic step. Cells incubated whit peritoneal fluid (PF) from endometriosis women, shows cellular adhesion increment at all kinetic steps (ANOVA $F = 30.0$; IC 95%, $p < 0.05$) *versus* value showed by control women LP, or fetal bovine sera used at the same protein concentration.

Conclusions: Work present here describes an *in vitro* model to evaluate cell adhesion; and shows different capacity between LP from endometriosis sterile and fertile women to promotes cell adhesion.

KEY WORDS: Endometriosis, cellular adhesion, sterility, peritoneal fluid.

REFERENCIAS

1. Prentice A. Endometriosis. Brit Med J 2001; 323: 93-5.
2. Dizerega GS, Barber DL, Hodgen GD. Endometriosis: Role of ovarian steroids in initiation, maintenance and suppression. Fertil Steril 1980; 33: 649-53.
3. Sharpe-Timms K. Endometrial anomalies in women with endometriosis. Ann NY Acad Sci 2001; 943: 131-47.
4. Ramey JW, Archer DF. Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. Fertil Steril 1993; 60: 1-14.
5. Blumenkrantz MK, Gallagher N, Bashore RA, Tenckhoff H. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. Obstet Gynecol 1981; 57: 667-70.
6. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984; 64: 151-4.



7. Zamah NM, Dodson MG, Stephens LC, Buttram VC, Besch PK, Kaufman RH. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic mice. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149: 591-7.
8. Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 94: 780-9.
9. Hernández-Guerrero C, Ortega-Vadillo F, Tlapanco-Barba R, Arriaga-Pizano L, Cérbulo-Vázquez A, González-Jiménez M. Alteración de la respuesta inmunológica sistémica en asociación con endometriosis, empleando un modelo de estudio animal. *Ginec Obstet Mex* 2002; 70: 171-81.
10. Nasir R, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski P. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65: 925-9.
11. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Ware M. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56: 45-51.
12. Vigano P, Vercellini P, DiBlasio AM, Colombo A. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56: 894-8.
13. Oosterlynck DJ, Lacquet FA, Waer M, Koninckx PR. Lymphokine activated killer activity in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1994; 37: 185-90.
14. Erick R. Integrins. *J Clin Invest* 1991; 87: 1-5.
15. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Coexpression of cytokeratin and vimentin in eutopic endometrium and endometriosis throughout the menstrual cycle: evaluation by computerized method. *Fertil Steril* 1995; 64: 69-75.
16. Viale G, Gambacorta M, Dell'Orto P, Coggi G. Coexpression of cytokeratins and vimentin in common epithelial tumors of the ovary: an immunocytochemical study of 83 cases. *Virchows Arch* 1997; 413: 91-101.
17. Nakopoulou L, Minaretzia D, Tsionou C, Mastrominas, M. Value of immunohistochemical demonstration of several epithelial markers in hyperplasia and neoplastic endometrium. *Gynecol Oncol* 1990; 37: 346-53.
18. Matthews J, Redfern C, Hirst B, Thomas E. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriotic tissue culture. *Fertil Steril* 1992; 57: 990-8.
19. Nissolle M, Donnez J, Casas-Roux R. Expression of steroid receptors, vimentin and cytokeratin in endometriotic tissue. In: H. Minaguchi (ed.). *Endometriosis today*. Kyoto Japan: The Pathenon Publishing Group; 1996.
20. Parry S, Strauss JF III. Premature rupture of the fetal membranes. *New Eng J Med* 2000; 338: 663-70.
21. van der Linden JQ, de Gopeij, FP, Erkens, DA. Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril* 1995; 63: 1210-6.
22. Mazzeo D, Vigano P, Di Blasio AM, Sinigaglia F, Vignali M, Panina-Bordignon P. Interleukin-12 and its free p40 subunit regulate immune recognition of endometrial cells: potential role in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 911-6.
23. Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS, Caudle MR. IL-1 β , TNF- α , and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 381-5.
24. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Endometriosis and free radicals. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 481: 29-35.
25. Iwabe T, Harada T, Tsudo T. Tumor necrosis factor alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 852: 824-9.
26. Sillem M, Prifti S, Monga B, Arslan T, Runnebaum B. Integrin mediated adhesion of uterine endometrial cells from endometriosis patients to extracellular matrix proteins is enhanced by tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1). *Reprod Biol* 1999; 872: 123-7.

27. García-Velasco JA, Arici A, Zreik T, Naftolin F, Mor G. Macrophage derived growth factors modulate Fas-ligand expression in cultured endometrial stromal cell: a role in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 1999; 57: 642-50.

