

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ESTUDIO DE LIGANDOS DE RECEPTORES NKG2D
DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER
Y DE LAS CITOQUINAS INMUNOMODULADORAS
IL-10 e IL-12 EN ENDOMETRIO EUTÓPICO DE MUJERES
CON ENDOMETRIOSIS**

MARISA TORRES TORRES

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
BIOLOGICAS, MENCIÓN INMUNOLOGÍA**

Directores de Tesis: Prof. Dra. María Cecilia Johnson Pena

Prof. Dra. María Carmen Molina Sampayo

2015

INDICE DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	I
INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS	III
RESUMEN	IV
SUMMARY	VII

INDICE

1.	Introducción	1
2.	Hipótesis	20
3.	Objetivos	20
3.1.	Objetivo general	20
3.2.	Objetivos específicos	20
4.	Materiales y Métodos	22
4.1.	Muestras	22
4.2.	Criterios	22
4.2.1.	Criterios de inclusión	22
4.2.2.	Criterios de exclusión	22
4.3.	Grupos de estudio	23
4.3.1.	Controles	23
4.3.2.	Pacientes con Endometriosis	23
4.4.	Tejido endometrial y procesamiento	24
4.5.	Obtención y cultivo de células estromales (ESC) y epiteliales (EEC)	25
4.6.	Metodologías	27
4.6.1.	Detección de mRNA de MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3	27
4.6.2.	Síntesis de cDNA	29
4.6.3.	Técnica de Amplificación en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	29
4.6.4.	Inmunohistoquímica (IHQ)	31
4.6.5.	Citometría de flujo	32
4.6.6.	Análisis hormonal	35
4.7.	Análisis estadístico y tamaño muestral	35
5.	Resultados	36
5.1.	Características clínicas, antropométricas y hormonales	36

5.2.	Detección de ligandos del receptor de activación NKG2D de células Natural Killer en tejido endometrial <i>ex vivo</i>	37
5.2.1.	Niveles de mRNA de MICA y MICB	37
5.2.2.	Presencia y localización de la proteína de MICA y MICB	37
5.2.3.	Niveles de mRNA de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3	40
5.2.4.	Presencia y localización proteica de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3	40
5.3.	Detección de citoquina IL-12 en endometrio eutópico <i>ex vivo</i>	44
5.3.1.	Nivel de mRNA de IL-12	44
5.3.2.	Presencia y localización de la proteína de citoquina IL-12	44
5.4.	Detección de citoquina de IL-10 en endometrio eutópico <i>ex vivo</i>	49
5.4.1.	Presencia y localización de la proteína de citoquina IL-10	49
5.5.	Detección de ligandos MICA y MICB en células endometriales aisladas	52
5.5.1.	Detección proteica de MICA y MICB por citometría de flujo	52
5.5.2.	Niveles de mRNA de MICA y MICB	55
5.5.3.	Detección proteica de ligandos de ULBP-1, -2 y -3 por citometría de flujo	58
5.5.4.	Niveles de mRNA de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3	61
6.	DISCUSION	60
7.	CONCLUSION	65
8.	BIBLIOGRAFIA	66

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

TABLA 1	Clasificación de los estadios del ciclo menstrual	25
TABLA 2	Partidores de genes para ligandos de NKG2D e Interleuquina	30
TABLA 3	Condiciones para amplificación génica por RT-PCR	30
TABLA 4	Anticuerpos utilizados en IHQ y Citometría de Flujo	34
TABLA 5	Antropometría, concentraciones hormonales y características de la endometriosis	36
FIGURA 1	Niveles mRNA MICA y MICB	38
FIGURA 2	Detección proteica de MICA y MICB en endometrio	39
FIGURA 3	Niveles mRNA ULBP-1 y ULBP-2	41
FIGURA 4	Niveles mRNA ULBP-3	42
FIGURA 5	Detección proteica de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3	43
FIGURA 6	Niveles mRNA IL-12 p40	45
FIGURA 7	Detección proteica de IL-12 en endometrio	46
FIGURA 8	Detección proteica de IL-12 en endometrio	47
FIGURA 9	Detección proteica de IL-12 en endometrio	48
FIGURA 10	Detección proteica de IL-10 en endometrio	50
FIGURA 11	Evaluación células positivas IL-10 en endometrio	51
FIGURA 12	Porcentaje de células positivas para MICA y MICB	53
FIGURA 13	Intensidad media de fluorescencia de MICA y MICB	54
FIGURA 14	Niveles mRNA de MICA y MICB en células epiteliales	56
FIGURA 15	Niveles mRNA MICA y MICB en células incubadas con E ₂ y PGE ₂	57
FIGURA 16	Porcentaje células positivas ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3	59
FIGURA 17	Intensidad de fluorescencia para ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3	60
FIGURA 18	Niveles mRNA ULBP en células epiteliales	62
FIGURA 19	Niveles mRNA ULBP en células incubadas con E ₂ y PGE ₂	63
ANEXO 1.	Consentimientos informados	
ANEXO 2.	Presentaciones a Congresos	

RESUMEN

La endometriosis es una enfermedad inflamatoria benigna que se caracteriza por la presencia y crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina (ectópico), cuya etiología y fisiopatología permanece aún sin aclarar. Se ha demostrado que el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis exhibe alteraciones moleculares, indicando que el defecto primario se encontraría en este tejido. Por otro lado, la desregulación del sistema inmune permite que las células endometriales que han llegado a la cavidad pélvica escapen de la vigilancia inmune, se implanten y proliferen, lo que favorece la formación de las lesiones ectópicas endometriales. Las células Natural Killer (NK) son linfocitos que participan en la inmunovigilancia y poseen un receptor de activación denominado NKG2D, el cual interactúa con diferentes ligandos (NKG2DL) expresados por células bajo estrés celular. Las interleuquinas (IL)-10 e IL-12 juegan un rol importante en la función inmunoreguladora, la cual involucra a macrófagos, linfocitos T y NK. Los niveles de NKG2DL, IL-10 e IL-12 en células endometriales del endometrio eutópico de mujeres con endometriosis no han sido estudiados hasta la fecha. Por lo tanto, en este trabajo, propusimos la siguiente hipótesis: “Durante el ciclo menstrual, en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis, los niveles de los ligandos del receptor NKG2D, activadores de las células Natural Killer (NK), se encuentran disminuidos, así como las citoquinas IL-10 e IL-12, lo que contribuye a la alterada respuesta inmunológica descrita en esta patología”. Para ello, se caracterizaron los niveles transcripcionales y la presencia de los ligandos MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 y de IL-10 e IL-12 en el endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis durante el

ciclo menstrual, así como se evaluó el efecto del estradiol y prostaglandina E2 en células endometriales aisladas de pacientes y controles, simulando el microambiente estrogénico e inflamatorio descrito en el endometrio de las pacientes con endometriosis. Se evaluaron los niveles de mRNA por RT-PCR y los niveles proteicos por inmunohistoquímica (IHQ) y citometría de flujo. Se detectó la expresión de todos los NKG2DL estudiados, tanto al nivel de mRNA como proteico, en ambos grupos de endometrios durante el ciclo menstrual, encontrándose que los niveles de MICA aumentaron en la fase secretora media y tardía en el grupo control, pero su expresión no presentó diferencia significativa durante el ciclo menstrual de las pacientes. En contraste, la expresión de MICB aumentó en la fase secretora inicial, disminuyendo fuertemente al final del ciclo en las mujeres con endometriosis. Los niveles de mRNA de ULBP-3 fueron significativamente mayores en el endometrio eutópico de las pacientes comparado al grupo control durante la fase secretora media, mientras que los niveles de ULBP-2 aumentaron gradualmente hacia las etapas finales del ciclo menstrual en ambos grupos, y los niveles de ULBP-1 no se modificaron durante el ciclo menstrual. Muy bajos niveles de mRNA de IL-12p40 fueron detectados en el endometrio control durante el ciclo menstrual, a diferencia del endometrio de fase secretora media de endometriosis, cuyos niveles fueron significativamente mayores que el grupo control. Por el contrario, la proteína IL-12 fue localizada en forma focal, aumentando su presencia solamente en el endometrio control secretor tardío. En forma similar, los niveles de la proteína IL-10 aumentaron significativamente en el compartimiento estromal control de la fase secretora tardía, y disminuyó en endometriosis en comparación al grupo control. En células

epiteliales aisladas de ambos grupos, se detectaron, al nivel proteico y transcripcional, los NKG2DL estudiados, encontrándose disminuidos en endometriosis comparados al grupo control. La presencia de estradiol y/o prostaglandina no modificó el nivel de mRNA de ningún ligando estudiado. En síntesis, hemos caracterizado, por primera vez, la expresión de los NKG2DL MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en el endometrio normal y patológico durante el ciclo menstrual. El aumento sostenido de los niveles de MICA y ULBP-2 hacia la fase secretora tardía sugiere una mayor activación de células NK en el tejido pre-menstrual normal que coincide con una reducida expresión de MICB en endometriosis. Por otro lado, la expresión diferencial de ULBP-3 e IL-12 en los endometrios secretores de endometriosis, además de la fuerte disminución en la expresión de IL-10 en la fase secretora tardía, podrían estar favoreciendo la implantación ectópica de los debris endometriales que arriban a la cavidad pélvica. Estos resultados sugieren que los ligandos del receptor NKG2D, principalmente MICA y ULBP-2, como también IL-10 e IL-12, jugarían un papel importante en las etapas finales del ciclo menstrual, período en que el endometrio experimenta una exhaustiva remodelación, preparándose para la acogida embrionaria o, en su defecto, para su eliminación a través de la menstruación. Las diferencias observadas en el endometrio de mujeres con endometriosis podrían explicar, al menos en parte, la infertilidad, como también la capacidad del tejido menstrual de escapar a la inmunovigilancia, como ha sido descrito en estas pacientes.

SUMMARY

Endometriosis is a benign inflammatory disease characterized by the presence and growth of endometrial tissue outside the uterus (ectopic), whose etiology and pathophysiology still remains unclear. It has been shown that the eutopic endometrium of women with endometriosis exhibits molecular alterations, indicating that the primary defect would be present in this tissue. On the other hand, deregulation of the immune system allows the endometrial cells that have reached the pelvic cavity to escape immune surveillance, which favors their implantation and proliferation, resulting in ectopic endometrial lesions. Natural Killer (NK) cells are innate lymphocytes that participate in immune surveillance. They express the activating receptor NKG2D, which interacts with different ligands (NKG2DL) on nucleated cells under cell stress. Interleukin (IL)-10 and IL-12 play a role in the immune regulatory function involving macrophages, T lymphocytes and NK cells. To date, the levels of NKG2DL, IL-10 and IL-12 on endometrial cells of the eutopic endometrium of women with endometriosis have not been described. Therefore, here we proposed the following hypothesis: "During the menstrual cycle, in the eutopic endometrium of women with endometriosis, the ligands of the NKG2D receptor, which activate natural killer (NK) cells, are decreased, as well as the cytokines IL-12 and IL-10, which contribute to the altered immune response described in this pathology". For this purpose, the transcriptional levels and the presence of MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 and ULBP-3 ligands and IL-10 and IL-12 were characterized in the eutopic endometrium of women with and without endometriosis during the menstrual cycle. We also evaluated the effect of estradiol and prostaglandin E₂ in isolated endometrial cells from patients and controls, simulating the estrogenic and inflammatory

microenvironment described in the endometrium of patients with endometriosis. The mRNA levels were evaluated by RT-PCR and the presence of proteins was assessed by immunohistochemistry (IHC) and flow cytometry. Both, mRNA and protein of all NKG2DL studied were detected in both groups of endometria during the menstrual cycle. MICA levels increased in the mid and the late secretory phases only in the endometrium of control individuals, although its expression did not show significant difference during all phases of the menstrual cycle in patients with endometriosis. In contrast, MICB expression increased in the early secretory phase and fell sharply in the late secretory phase only in the endometrium of women with endometriosis. The mRNA levels of ULBP-3 were significantly higher in the eutopic endometrium from patients compared to controls during the mid-secretory phase. In addition the mRNA levels of ULBP-2 gradually increased towards the end of the menstrual cycle, while ULBP-1 did not change during the menstrual cycle in both groups of individuals. Very low levels of IL-12p40 mRNA were detected in the control endometrium during the menstrual cycle, which differed from the mid secretory phase in the endometrium of women with endometriosis, which presented significantly higher IL-12p40 messenger levels than the control group. In contrast, IL-12 protein levels were focally localized in the endometrial tissue, and its expression increased significantly only in the late secretory control endometrium. Similarly, the IL-10 protein increased significantly in the late secretory phase in the control stromal and epithelial compartments, whereas its levels reduced significantly in endometriosis compared to the control group in the same menstrual cycle phase and tissue compartments. IL-10 mRNA levels were not detected in any endometrium. We detected the expression of all NKG2DL studied both, at the mRNA and protein levels, in epithelial cells isolated from the endometrium

of both groups. However, the transcripts and protein levels of these ligands were decreased in endometriosis compared to the control group. The presence of estradiol and/or prostaglandin did not affect the level of mRNA of any ligand studied. In summary, we have characterized, for the first time, the expression of the NKG2DL MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 and ULBP-3 in normal and pathological endometrium during the menstrual cycle. The sustained increase in MICA and ULBP-2 expression towards the late secretory phase suggests a greater activation of NK cells in the healthy premenstrual tissue, which coincides with a reduced expression of MICB in endometriosis. On the other hand, the differential expression of ULBP-3 and IL-12 observed in the secretory endometrium of women with endometriosis, in addition to the sharp decline in IL-10 expression observed in the late secretory phase in these patients, may favor the ectopic implantation of endometrial debris that reach the pelvic cavity. These results suggest that NKG2D receptor ligands, mainly MICA and ULBP-2, as well as IL-10 and IL-12 play an important role in the final stages of the menstrual cycle, during which the endometrium undergoes extensive remodeling preparing for embryo implantation or otherwise for disposal through menstruation. The results obtained herein in relation to the endometrium of women with endometriosis may partially explain infertility, as well as the ability of the menstrual tissue to escape immune surveillance, as described in these patients.

1. INTRODUCCION

ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es una patología ginecológica benigna que se caracteriza por la presencia y crecimiento de tejido endometrial en lugares ectópicos y es la causa más común de dolor pélvico. Afecta entre un 10-20% de mujeres en edad reproductiva y en un 30-50% de mujeres con infertilidad (D'Hooge et al., 2003, Baston et al., 2014), mientras que, en mujeres con dismenorrea, la incidencia de endometriosis es de un 40-60% (Farquhar, 2000).

A pesar que numerosos estudios han investigado este desorden ginecológico (Guarnaccia, 1997), el conocimiento de su etiología y fisiopatología permanece sin aclarar. Algunas teorías existentes intentan explicar el mecanismo involucrado en el desarrollo de la patología, siendo una de ellas la “Teoría de la Menstruación Retrógrada” (Sampson, 1927) la que sugiere que las células endometriales que se desprenden durante la menstruación pasan a través de la tuba uterina a sitios ectópicos, y, una vez allí, se implantan y multiplican en las cavidades abdominal o pélvica. Sin embargo, este tipo de menstruación es un fenómeno que ocurre normalmente en las mujeres en edad reproductiva, y sólo en algunas de ellas, por causas aún no establecidas, el tejido endometrial se implanta en localizaciones ectópicas, dando origen a la endometriosis (Olive y Schwartz, 1993; Dmowsky et al., 1994). La discrepancia entre la incidencia de menstruación retrógrada y la ocurrencia de endometriosis puede ser explicada por la presencia de factores “permisivos” que promoverían la implantación y crecimiento de células endometriales (Melega et al., 1991).

Diagnóstico de endometriosis

El diagnóstico preciso de esta patología se logra a través de la visualización directa de los implantes endometriósicos (patrón de oro) mediante procedimientos quirúrgicos invasivos, como laparoscopia y, en menor grado, por laparotomía, donde, además, es posible tomar una muestra del tejido afectado para su análisis histopatológico. Debido a que la etiología de la endometriosis aún no se ha establecido, y su diagnóstico es invasivo, numerosos potenciales factores han sido investigados, incluyendo citoquinas, hormonas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, entre otros, en suero, plasma y/u orina de las pacientes, la composición bioquímica y celular del líquido peritoneal, la respuesta inmune local y sistémica y las características del endometrio eliminado de la cavidad uterina (Arici et al., 1997). Algunas investigaciones han resaltado la importancia del análisis molecular de la biopsia endometrial como una potencial herramienta de diagnóstico debido a la expresión diferencial de moléculas en el endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis (Al-jefout et al., 2009; Bokor et al., 2009; Fassbender et al., 2012).

Endometrio eutópico

Se ha demostrado que el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis presenta alteraciones, mostrando diferencias bioquímicas y moleculares al compararlo con el endometrio de mujeres sanas (Kao et al., 2003; Johnson et al., 2004; Hudelist et al., 2005), lo que ha llevado a los investigadores a plantear que el defecto primario se encontraría en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis.

Entre los mecanismos alterados podemos señalar la disminución de la apoptosis de las células endometriales eutópicas y ectópicas, lo que puede contribuir al desarrollo de los

implantes (Vigano et al., 2004; Johnson et al., 2005). Por otro lado, se ha visto que la respuesta a esteroides y el contenido de sus receptores en el endometrio eutópico de endometriosis presentan expresión diferente al compararlo con endometrio control (Attia et al., 2000, Ulukus et al., 2006).

Las hormonas esteroidales ejercen su acción a través de la unión a su receptor nuclear en la célula blanco. La acción del estradiol, por ejemplo, es mediada por los receptores alfa y beta ($RE-\alpha$ y $RE-\beta$); en tanto, la acción de la progesterona es mediada por los receptores A y B (RP-A y RP-B). El endometrio humano normal expresa en forma predominante $RE-\alpha$, mientras los receptores de progesterona RP-A y RP-B se expresan en forma temporal y espacial definidas, co-expresándose ambas isoformas en el epitelio y estroma durante la fase proliferativa, desapareciendo en el epitelio y perdurando principalmente la isoforma RP-A en el estroma durante la fase secretora del ciclo menstrual (Ulukus et al., 2006). En endometriosis, cambios en las razones de los receptores $RE\alpha/RE\beta$ y RP-A/RP-B han sido descritos tanto en tejidos como en células aisladas (Attia et al., 2000, Ulukus et al., 2006), evidenciándose una reducida respuesta a la progesterona en el endometrio eutópico y ectópico de estas pacientes (Brauner-Tran et al., 2002).

Esta resistencia a la acción protectora de la progesterona estaría dada principalmente por el aumento del RP-A, el cual tiene una función represora sobre el RP-B, el cual activa la expresión de numerosos genes blanco de la progesterona (Vigano et al., 2004), Entre estos genes, la enzima 17β -HSD tipo 2, que cataliza la conversión de estradiol a estrona, se expresa deficientemente en los implantes endometriósicos, por lo que habría una elevada concentración de estradiol requerido para el crecimiento y mantención de los implantes en la cavidad peritoneal (Attia et al., 2000, Ulukus et al.,

2006). Además, en las mujeres con endometriosis, tanto en el endometrio eutópico como en el ectópico se ha descrito la producción local de estrógenos mediada por la enzima $P_{450}Arom$ (aromatasa), la cual cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos, lo que contribuye a mantener un ambiente estrogénico en estas pacientes (Noble et al., 1996; Johnson et al., 2004; Bulun 2009).

Otros factores que favorecen la invasión de las células endometriales al peritoneo son modulados por las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) y por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), esenciales para la remodelación cíclica que ocurre en el endometrio normal durante el ciclo menstrual (Osteen et al., 1994; Salamonsen et al., 1997; Collette et al., 2004). En las pacientes con endometriosis, la expresión de MMPs está aumentada, mientras que la expresión de TIMPs se encuentra disminuída (Liu et al., 2002; Vigano et al., 2004; Collete et al., 2004). Además, el ambiente peritoneal es altamente angiogénico en estas pacientes esencial para el crecimiento y viabilidad de los explantes endometriales ectópicos, (McLaren et al., 1996). Entre los factores relacionados con inflamación y regulación inmune en endometriosis, se han reportado la interleuquina 1 beta ($IL-1\beta$), el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), y prostaglandina E_2 (PGE_2) (Vigano et al., 2004).

Endometriosis e Inmunidad

La endometriosis es considerada una enfermedad pro-inflamatoria con elevadas concentraciones de citoquinas y factores de crecimiento presentes en el líquido peritoneal y con un aumentado número de macrófagos activos peritoneales, pero con disminuida capacidad fagocítica (Lebovic et al., 2001; Vigano et al., 2004). En este

contexto, es preponderante la citoquina pleiotrópica factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), que se expresa en células epiteliales y estromales endometriales durante el ciclo menstrual. En mujeres con endometriosis, el incremento en los niveles de TNF- α en el líquido peritoneal, producto del aumento de la actividad de los macrófagos peritoneales, mediaría el desarrollo y mantención de la patología participando en la proliferación de las células endometriales, en la estimulación de la adherencia de las células estromales, en la invasión tisular por la regulación de MMPs y en la angiogénesis por la inducción de IL-8 (Vigano et al., 2004). Además, este factor estaría directamente correlacionado con el estado de la enfermedad, específicamente con la endometriosis moderada (Vigano et al., 2004; Ulukus et al., 2006).

En la eliminación del tejido endometrial en la cavidad peritoneal participa el sistema inmune, proceso que presenta una serie de alteraciones en las pacientes con endometriosis, lo que les confiere a las células endometriales de endometriosis la habilidad para escapar de la inmunovigilancia (Baston et al., 2014). Estas alteraciones afectan a diferentes componentes de la inmunidad, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), cuyo clivaje está aumentado en las células endometriales eutópicas y en los implantes endometriósicos de mujeres con endometriosis, incrementando la concentración de la forma soluble de la proteína (sICAM-1) en el suero y fluido peritoneal. ICAM-1 normalmente se une al antígeno de superficie de leucocitos LFA-1 activando a la célula. La forma soluble sICAM-1, compite por la unión a este antígeno de superficie, lo cual es crítico para el reconocimiento del sistema inmune (Somogliana et al. 1996, Ulukus et al. 2006; Pino et al., 2009).

También se ha descrito una disminuida actividad citotóxica de las células Natural Killer (NK) en la cavidad peritoneal (Ulukus et al. 2006), y la inducción de apoptosis en cé-

lulas del sistema inmune a través de mecanismos que involucran a Fas-Fas ligando (FasL), ya que se ha encontrado una expresión incrementada de FasL por diferentes citoquinas y factores de crecimiento en las células endometriales secretadas que han migrado hacia la cavidad peritoneal. FasL, al unirse a Fas, localizado en las células del sistema inmune, gatilla la muerte de estas células por apoptosis (García-Velasco et al. 2002; Ulukus et al. 2006).

Los datos disponibles en la literatura sugieren una asociación entre endometriosis y alteraciones en la inmunidad mediada por células (Dmowski et al., 1994). Hallazgos *in vitro* proporcionaron evidencias que la eliminación de células endometriales por el sistema inmune sería responsable de la protección contra el crecimiento de células endometriales en sitios ectópicos (Vigano et al., 1991, 1994; Oosterlynck et al., 1991, 1992; Ho et al., 1995).

Una hipótesis propuesta para la etiología de la endometriosis sostiene que existirían fallas en el sistema de inmunovigilancia, como defectos en la actividad de células NK, macrófagos y linfocitos T. Esto afectaría la capacidad de remoción de células endometriales, con ausencia o disminución en la eliminación de fragmentos de tejido endometrial y debris menstruales que migran hacia la cavidad peritoneal vía menstruación retrógrada, generándose focos endometriósicos incipientes (Seli y Arici, 2003).

Células Natural Killer (NK)

Las células NK forman un subgrupo dentro de los leucocitos, que, de acuerdo a sus características histológicas, a la expresión de marcadores linfoides en su superficie y por su origen desde el precursor celular de la línea linfóide en médula ósea, han sido

clasificadas como linfocitos. Además, las NK fueron descritas como linfocitos efectores citolíticos que, semejante a los linfocitos T citotóxicos, pueden directamente inducir la muerte de células tumorales e infectadas por virus en ausencia de sensibilización antigénica, y son consideradas componentes de la inmunidad innata debido a que no presentan receptores de superficie celular antígeno-específicos (Vivier et al., 2011).

Diversas actividades funcionales han sido asociadas con las células NK, incluyendo la citotoxicidad “natural” (inmediata) y la capacidad de producción rápida de citoquinas (TNF- α e Interferon- γ) y quimioquinas (IL-8), las cuales ayudan a generar y sostener un ambiente inflamatorio. Estas células también producen citoquinas inmunosupresoras (IL-10) y factores de crecimiento. Las NK participan en un sistema de defensa temprana con diferentes funciones efectoras, las que incluyen la lisis de células blanco, y/o el reclutamiento de células hematopoyéticas (neutrófilos y macrófagos), activando células dendríticas (DCs) y linfocitos (T y B) (Di Santo et al., 2007; Watzel et al., 2005).

La citotoxicidad mediada por las células NK y la producción de citoquinas afectan a células dendríticas, macrófagos y neutrófilos y dotan a las células NK con funciones reguladoras que modulan las respuestas celulares antígeno- específicas de linfocitos T y B. Por otro lado, las células NK requieren de la estimulación de varios factores, tales como IL-15, IL-12 o IL-18 (Guia et al., 2008; Chaix et al., 2008), que permiten desarrollar su potencial efector y su interacción con otros componentes de la respuesta inmune. Aún más, las células NK son peculiares en su capacidad para invadir el útero, y contribuyen al mantenimiento del embrión en la cavidad endometrial (Moffett-King, 2002).

En cuanto a su regulación, la función de las células NK es controlada por un balance entre señales negativas y positivas transmitidas por receptores de inhibición y

activación, expresados en su superficie celular. Receptores de inhibición, tales como el receptor celular humano killer tipo-Ig, han sido bien estudiados (Parham P., 2005), y dentro de los receptores de activación, NKG2D es el receptor de activación mejor caracterizado de las células NK, el cual ha mostrado ser importante para gatillar la citotoxicidad de estas células (Wei et al., 2010).

Receptor NKG2D

El miembro D del grupo 2 de Natural-Killer (NKG2D), identificado como un receptor de activación de NK del tipo lectina (Bauer et al., 1999), inicia una respuesta citolítica mediada por perforina, jugando un rol clave en la muerte celular mediada por las células NK (Hayakawa et al., 2002; Lopez-Larrea et al., 2008).

El receptor NKG2D pertenece a la familia de proteínas transmembrana tipo II semejante a lectinas tipo-C y funciona como un receptor activador y co-estimulador. Este es codificado por un gen en el cromosoma 12 en humanos, ubicado dentro del complejo de genes de células NK. NKG2D es expresado como homodímero en células NK, y subtipos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Raulet DH., 2003).

La asociación de moléculas adaptadoras (DAP10 en humanos, DAP10 y DAP12 en ratones) con NKG2D es esencial para la señalización intracelular y se considera importante para su expresión en la superficie celular (Wu et al., 1999; Gilfillan et al., 2002). DAP10 es una proteína transmembrana tipo I con residuos de ácido aspártico conservados en su región transmembrana que interactúan con la carga positiva de residuos de arginina en la región transmembrana de NKG2D. Las señales de transducción a través de DAP10 se logran por el motivo intracelular YxxM que fosforila tirosinas, uniéndose al complejo receptor vía PI3K/Grb-2-Vav (Phillips et al., 1999;

Upshaw et al., 2006). Cada homodímero de NKG2D se ensambla sobre la superficie celular con 2 dímeros de DAP10, formando una estructura hexamérica (Garrity et al., 2005), lo cual probablemente sirve para reducir los niveles de ligandos requeridos para inducir la transducción de señales. Una vez activado, el complejo hexamérico fosforilado NKG2D-DAP10 puede unirse potencialmente a múltiples proteínas adaptadoras, tal como la subunidad p85a del fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Raulet et al., 2003). La activación de PI3K iniciada por NKG2D lleva a la fosforilación de la vía MAPK requerida para la función de citotoxicidad (Huang et al., 2002). Diferentes estímulos (IL-15, IL-12, IFN) pueden influenciar la activación y expresión de proteínas en la vía de señales NKG2D-DAP10 (Bustelo, 2001).

La exposición crónica a los ligandos del receptor NKG2D (NKG2DL) es capaz de mediar la disminución y reducción de la citotoxicidad mediada por NKG2D (Oppenheim et al., 2005; Couder et al., 2005). La secreción de citoquinas y la citotoxicidad mediada por NKG2D resulta del fino equilibrio entre los receptores de activación e inhibición, y este balance define las respuestas inmunes mediadas por células NK las que pueden detectar moléculas inducidas en condiciones de estrés celular (Bottino et al., 2005).

Ligandos del receptor NKG2D

La existencia de un mecanismo fisiológico de citotoxicidad mediada por células NK hacia células endometriales autólogas ha sido reportado como defectuoso en pacientes con endometriosis y se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Mazzeo et al., 1998). En sangre periférica de mujeres control y con endometriosis no se han visto diferencias en los porcentajes de células NK (Garzetti et al., 1993; Iwasaki et al., 1993; Zhang et al., 2006; Hassa et al., 2009), pero su actividad citolítica en la cavidad

peritoneal está disminuida, pese a que su número no muestra alteración y la expresión del receptor inhibitor de células NK (KIR) está aumentada en mujeres con endometriosis, lo que podría explicar su disminuida actividad. (Oosterlynck et al., 1991; Ulukus et al., 2006)

Por otro lado, el receptor NKG2D interactúa con varios ligandos (NKG2DL) que son expresados en baja cantidad en la mayoría de los tejidos, pero son sobre-expresados bajo estrés celular, como, por ejemplo, en respuesta al daño al DNA (Raulet y Guerra, 2009). Para lograr un blanco específico, NKG2D se une a una variedad de ligandos, que, en humanos, son la molécula A relacionada a cadena MHC de clase I (MICA), secuencia B polipeptida-relacionada a MHC clase I (MICB), y UL-binding proteins 1–6 (ULBP1-6)], las cuales pueden ser expresadas en cualquier tipo de célula bajo estrés (Li et al., 2001; Cosman et al., 2001; Chalupny et al., 2003; Bacon et al., 2004; Serrano et al., 2011; Courtney et al., 2014). Por lo tanto, estas proteínas generalmente no son expresadas en células normales, pero pueden ser inducidas por estrés celular, transformación tumoral e infecciones virales y bacterianas (Vivier et al., 2002; Watzl C. 2003; Burgess et al., 2008; Venkataraman et al., 2007). Sin embargo, el patrón de la expresión de estos ligandos de activación de células NK no se conoce en el endometrio normal ni patológico.

Menstruación y estrés celular

El oxígeno, necesario para la mantención de la vida celular, genera especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como radical superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno, los cuales tienen efectos perjudiciales sobre la célula, incluyendo daño a

proteínas, DNA y peroxidación lipídica, que primariamente afecta la función y estructura de la membrana celular (Fridovich I, 1983; Slater T., 1984).

Dado que ROS son generados, y la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) es altamente expresado en células epiteliales y estromales en el endometrio, es posible que ROS y SOD jueguen importantes roles como reguladores locales de la función endometrial, en procesos tales como la decidualización y la menstruación (Sugino et al., 1996).

En el útero, la progesterona secretada por el cuerpo lúteo provoca la decidualización del endometrio, lo cual es necesario para una implantación exitosa. Sin embargo, cuando no ocurre fecundación después de la ovulación, el endometrio es eliminado, inducido por el descenso de la progesterona, lo que es necesario para preparar el endometrio para el próximo ciclo. Por otra parte, la actividad de SOD en el endometrio aumenta desde la fase proliferativa, alcanzando su máximo en la fase secretora media (día 19-23 del ciclo) (Sugino et al., 1996). En la menstruación participan una variedad de sustancias bioactivas, tales como prostaglandinas (PG), proteinasas y citoquinas. PG es bien conocida como factor responsable de eliminación endometrial (Baird et al., 1996; Marbaix et al., 1996). Hay vasoconstricción de los vasos sanguíneos seguida de vasodilatación en el endometrio previo a la menstruación. Las concentraciones de PG aumentan hacia la fase secretora tardía (día 24-28 del ciclo endometrial), siendo mayores en la menstruación; además, se ha reportado que la producción de PG es regulada por ROS (Sugino et al., 2001).

En el endometrio humano, las actividades de SOD disminuyen y los niveles de peróxido lipídico (que participan en la generación de ROS) aumentan en la fase secretora tardía justo antes de la menstruación. Estudios demostraron que el peróxido de hidrógeno

estimula la producción de PG en células endometriales humanas. Por lo tanto, se ha observado una cerrada relación entre SOD, ROS y PG en la regulación de la menstruación (Sugino et al., 2001).

Citoquinas IL-12 e IL-10

IL-12 es una citoquina pleiotrópica con diferentes funciones celulares: efectos estimulatorios sobre células NK, linfocitos T, inducción de la expresión de citoquinas, incluyendo IFN- γ y generación de linfocitos Th1 secretores de IFN- γ (Trinchieri y Gerosa, 1996) y aumento de la citotoxicidad mediada por células (Stern et al., 1990; Gately et al., 1992; Schmitt et al., 1994; Langrish et al., 2004). La producción de IL-12, mayoritariamente por macrófagos, es un evento clave durante las respuestas de inmunidad innata (Trinchieri, 1998); además, induce la secreción de IFN- γ , lo que resulta en el aumento de la fagocitosis, producción de óxido nítrico, y un aumento explosivo de ROS, con consecuente aumento de la actividad citotóxica y destrucción de patógenos. El IFN- γ es una citoquina que regula una variedad de eventos inmunológicos de crucial importancia en el desarrollo de la inmunidad innata y adquirida. Está involucrada en la activación de macrófagos, proliferación y función de linfocitos T, y aumento de la actividad citotóxica de las células NK. Los linfocitos T y NK son las células capaces de producir IFN- γ en respuesta a una variedad de estímulos.

IL-12 aumenta la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de NKG2D por inducción de una más eficiente activación de las cascadas de señales gatilladas por este receptor (Girart et al., 2007). A su vez, IFN- γ regula positivamente la producción de IL-12 para amplificar la respuesta inflamatoria, así se necesitan reguladores negativos de IL-12 para controlar y prevenir la destrucción de las células propias (Trinchieri G.,

1998). Dado que IL-10 es un fuerte inhibidor de la secreción de IL-12 por monocitos/macrófagos (D'Andrea et al., 1993), su producción por las células NK puede representar una retroalimentación negativa a la sobre-expresión de IL-12. IL-10 e IL-12 son dos importantes citoquinas que regulan las células T (Kennedy et al., 1994). La citoquina IL-12 puede cambiar linfocitos Th hacia el fenotipo predominante Th1, mientras que IL-10 puede cambiar hacia el fenotipo predominante Th2, que favorece mecanismos de inmunosupresión en relación a las actividades de NK. Las células NK tratadas con IL-12, exhiben aumentado reconocimiento de células endometriales (Mazzeo et al., 1998).

Así, ambas IL-12 e IL-10 pueden jugar un importante rol en la función inmunoreguladora involucrando macrófagos, linfocitos T y NK en el tejido endometrial eutópico y ectópico (Yang et al., 1997).

Infertilidad en endometriosis

Los estudios sobre tasa de embarazos son controversiales; algunos indican que serían similares a los de grupos de pacientes con factor tubárico o estériles de causa desconocida, e independientemente del grado de la endometriosis (Olivennes et al., 1995; Huneus et al., 2000), aunque otros señalan un menor índice de gestaciones (Chillik et al., 1985; Arici et al., 1997), especialmente en los estadios III y IV de la enfermedad (Chillik et al., 1985; Matson et al., 1986).

Como potenciales responsables del fracaso reproductivo asociado a la endometriosis se han postulado diferentes factores: factores mecánicos/anatómicos en los grados III y IV de la enfermedad; factores endocrinos, tales como foliculogénesis deficiente, anovulación, síndrome de luteinización folicular, defectos luteínicos e

hiperprolactinemia; factores inmunológicos (aumento del volumen de líquido peritoneal, aumento del número y actividad de los macrófagos peritoneales así como de las prostaglandinas y citoquinas), los cuales tendrían efectos citotóxicos para el espermatozoide, ovocito, la fecundación y fases iniciales del desarrollo embrionario; y factores en la implantación con reducción de la receptividad endometrial (disminución de la expresión de integrinas) y aumento de los abortos preclínicos por el componente de desequilibrio de prostaglandinas y citoquinas (Cochery-Nouvellon et al., 2009; Courtney et al., 2014), asociado a la presencia de endometrio ectópico.

Además del rol fundamental de las células NK en la defensa del hospedero, estas células también apoyan la vascularización uterina asociada al embarazo. La actividad de células NK es regulada por la integración de señales derivadas de receptores de activación e inhibición. Esto sugiere que en orden a establecer un embarazo exitoso, el status de activación debe estar sobre cierto umbral (Riley et al., 2008). Las células uNK son un subtipo celular único, no observado en otros tejidos, demostrando que estas especiales células NK son inactivas en el endometrio antes de la concepción y simplemente esperan el embarazo (Manaster et al., 2008). Las células NK deciduales (dNK) están presentes en la interfaz materno fetal durante la gestación, y se cree que ellas son importantes para el embarazo normal (Croy et al., 2006; Manaster et al., 2008). Modelos murinos sugieren que las células NK son importantes para la normal implantación y desarrollo embrionario, a través de la producción de Interferon gamma. Ratones deficientes de células NK uterinas (uNK), aunque fértiles, muestran sitios anormales de implantación, teniendo incompleta ampliación de los vasos sanguíneos y significativa patología decidual (Croy et al., 2006).

En resumen, en el endometrio ocurren reacciones que generan estrés celular y también hay presencia de moléculas mediadoras de estrés, las que estarían participando en la regulación de la respuesta inmune, como, por ejemplo, podrían estar favoreciendo la expresión de ligandos de activación del receptor NKG2D durante las etapas tardías del ciclo menstrual, lo que llevaría a un perfil de tipo Th1, con producción de IL-12 e IFN- γ . La disminución de estrés estaría relacionada a respuestas Th2, con liberación de la citoquina inmunosupresora IL-10, como ocurre en el embarazo (respuesta que quizás podría estar ocurriendo también en endometriosis).

En base a estos antecedentes, el objeto de esta investigación fue estudiar la presencia de los ligandos de activación de NKG2D (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, y ULBP3) en células endometriales, y la expresión de citoquinas inmunomoduladoras IL-12 e IL-10 en endometrio eutópico de mujeres con endometriosis a través de las distintas fases del ciclo menstrual, y observar si existían diferencias en la presencia de estas moléculas que pudiesen entregar antecedentes sobre el escape inmune que se ha observado ocurre con el tejido eutópico que sale a la cavidad pélvica y otras localizaciones en estas pacientes.

2. HIPÓTESIS

“Durante el ciclo menstrual, en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis, los ligandos del receptor NKG2D, activadores de las células Natural Killer (NK), se encuentran disminuidos, así como las citoquinas IL-12 e IL-10, lo que contribuye a la alterada respuesta inmunológica descrita en esta patología”.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- Caracterizar ligandos de activación de células NK y citoquinas inmunomoduladoras en endometrio eutópico de mujeres con endometriosis durante el ciclo menstrual.

3.2. Objetivos Específicos:

1. Conocer el perfil de expresión de los transcritos y detectar la presencia, al nivel proteico, de los ligandos de NKG2D MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3 en endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis en las distintas fases del ciclo menstrual.
2. Analizar, a nivel transcripcional y/o proteico, la expresión de las citoquinas IL-12 e IL-10 durante el ciclo menstrual en el endometrio eutópico de mujeres con y sin endometriosis.

3. Detectar los niveles de expresión de los ligandos del receptor NKG2D MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3 en células epiteliales y estromales aisladas de endometrios provenientes de mujeres con y sin endometriosis.

4. Estudiar el efecto de un microambiente estrogénico y pro-inflamatorio sobre los niveles de mRNA de los ligandos del receptor NKG2D en células endometriales epiteliales incubadas con estradiol y prostaglandina E2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) dentro del marco del Proyecto Fondecyt 1120074 y en el Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), ambos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.1. Muestras

En este estudio, las muestras de tejido endometrial eutópico se obtuvieron de mujeres que acudieron al servicio de Ginecología y al Policlínico de Infertilidad del Hospital Clínico San Borja Arriarán (HCSBA), Campus Centro de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, quienes firmaron un consentimiento informado aprobado por los comités de ética de la Universidad de Chile y del Servicio de Salud Metropolitano Central (Anexo 1).

4.2. Criterios

4.2.1. Criterios de Inclusión

Los grupos de estudio incluyeron a mujeres en edad reproductiva entre 20 y 45 años sometidas a esterilización tubaria vía laparoscópica o a histerectomía por indicación ginecológica benigna de causa no endometrial (controles), o a cirugía laparoscópica diagnóstica de endometriosis (pacientes).

4.2.2. Criterios de Exclusión

Como criterio de exclusión, para este estudio, se consideraron la existencia de enfermedades neoplásicas, endocrinas o infecciones al momento de tomar la

muestra o mujeres con tratamientos hormonales o que hicieron uso de anticoncepción hormonal dentro de 3 meses previos al ingreso al estudio.

4.3. GRUPOS DE ESTUDIO

4.3.1. Controles

Mujeres eumenorreicas, sin patologías reproductivas, sometidas a esterilización tubaria por laparoscopia o a histerectomía por indicación ginecológica benigna no endometrial (n=41).

4.3.2. Pacientes con Endometriosis

Mujeres sometidas a laparoscopia diagnóstica para endometriosis peritoneal u ovárica confirmada quirúrgicamente (n=40). La etapificación de la endometriosis se sub-dividió en endometriosis mínima-leve (I-II, puntaje 1-16) y moderada-severa (III-IV, puntaje >16), según los criterios de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, 1997).

4.4. Tejido endometrial y procesamiento

Biopsias de endometrio de pacientes y controles se obtuvieron durante la cirugía laparoscópica mediante Pipelle de Cornier desde el fondo del útero. Los tejidos se transportaron y mantuvieron a 4°C en tampón fosfato salino (PBS 1X estéril) hasta su procesamiento. Posteriormente, el tejido se lavó varias veces con PBS frío para remover la sangre y mucosidades y se fraccionó de la siguiente forma:

- a) Un trozo de tejido se fijó en formaldehído al 3,5% para ser incluido en parafina y obtener cortes histológicos que se utilizaron para técnica inmunohistoquímica y para realizar fechaje endometrial (*dating*).
- b) Algunos trozos de tejido endometrial se transfirieron a criotubos y se congelaron en nitrógeno líquido para luego ser almacenados a -80°C (tejido para extracción de RNA).
- c) Un trozo de tejido se utilizó para obtener dos fracciones celulares, una correspondiente a células endometriales estromales (ESC) y la otra a células endometriales epiteliales (EEC). La obtención y cultivo de estas células se detalla en la Sección 4.6.

El estadio del ciclo menstrual de las muestras de endometrio se clasificó histológicamente, según el criterio de Noyes (Noyes et al. 1950) por un anatómo-patólogo experimentado (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los estadios del ciclo menstrual.

Fase del Ciclo	Rango de Días
Proliferativo	Pro: día 6 – 14
Secretor Inicial	SI: día 15 – 18
Secretor Medio	SM: día 19 – 23
Secretor Tardío	ST: día 24-28

4.5. Obtención y cultivo de células estromales (ESC) y epiteliales (EEC)

Para la obtención de células estromales y epiteliales, fragmentos de la biopsia endometrial se cortaron con bisturí repetidas veces hasta obtener un homogenizado de

consistencia pastosa, el cual se sometió a digestión enzimática con colagenasa tipo I (1 mg/mL; Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, EEUU), en 10 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma. Co., St Louis, MO, EEUU) y 10 μ L de DNAsa I (25 μ g/mL; Sigma) en baño termorregulado a 37° C con agitación horizontal por 60 minutos, según se describe en Johnson et al. (2004).

Transcurrido el tiempo señalado, se dejó decantar el tejido digerido por 10 minutos y se obtuvo un sedimento mayoritariamente consistente de glándulas endometriales y una suspensión con predominio de células estromales. Se recogió el sobrenadante cuidadosamente y se filtró a través de 2 filtros con malla de nylon de 100 y 40 μ m de tamaño del poro (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, EEUU) para excluir restos de glándulas remanentes.

En seguida, se centrifugó la suspensión celular a 1830 x g por 10 minutos, obteniendo un pellet de células estromales, el cual se lavó dos veces con medio libre de enzima, y finalmente, se resuspendió en 1mL de medio de cultivo (medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, EEUU), Glutamax (2 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Penicillina - Estreptomina (100 IU/mL- 0.1 mg/mL (Invitrogen), Fungizona (0,25 ug/mL) (Invitrogen), ácido ascórbico (2,5 ug/ml) (Sigma), insulina (0,1 IU/mL) (Actrapid^R, Novo Nordick A/S, Dinamarca).

El sedimento glandular se lavó 2 veces con medio libre de enzima y se incubó durante 40 minutos en frasco de cultivo de 75 cm² (20 minutos por cada lado) para permitir la adhesión de células estromales contaminantes.

Ambos tipos de células se sembraron en frasco de cultivo de 75 cm² con 10 mL de medio de cultivo en un incubador al 5% de CO₂ y 37°C hasta alcanzar una confluen-

cia del 80%. Durante este proceso, los medios de cultivo se renovaron cada 72 horas. Luego, las células se suspendieron con tripsina-EDTA (5 mg/mL-3,7 mg/mL, respectivamente) (Invitrogen), se contaron y una parte de ellas (2×10^6 células) se suspendió en SFB con 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) y se mantuvieron a -80°C por 48 h y posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. El resto de las células se resembraron 250.000 células/pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos (35 mm de diámetro) (Costar/Corning, NY, MA, EEUU). Para los estudios de mRNA, se dejaron crecer las células hasta alcanzar 80% de confluencia, y luego se privaron de SFB por 24 horas al incubarlas con DMEM definido (DMEM, 0.1% p/v albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma), 25 mmol/L HEPES (Sigma), 2 mmol/L Glutamax (Invitrogen), 100 IU/mL penicilina, 5 mg/mL estreptomycin (Invitrogen), para posteriormente realizar los tratamientos a estudiar: 10^{-8} mol/L Estradiol (E_2) (Sigma) o 10^{-8} mol/L Prostaglandina (PGE_2) (Sigma), como se indica en Castro et al. (2015).

La pureza de las células estromales y epiteliales aisladas se evaluó mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos monoclonales (mAb) contra vimentina, citoqueratina y CD45 como se describió previamente (Pino et al., 2009) arrojando una pureza > 95% para ambos tipos celulares.

4.6. METODOLOGIAS

4.6.1. Detección de mRNA de MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3.

Extracción de RNA a partir de tejido ex vivo y cultivos celulares.

Procedimiento: Un trozo de biopsia endometrial, almacenado a -80°C , se transfirió

a un tubo eppendorf de 1,5 mL. A cada tubo (tejido *ex vivo*) o pocillo de placa (cultivo celular), se le agregó un total de 1000 uL de TRIZOL (Invitrogen)-glicógeno (25 ug/mL, Chemicon Co) que contiene fenol y guanidinio isotiocianato el que ayuda a mantener la integridad del RNA durante el proceso. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregaron 200 ul de cloroformo (Merck) por muestra para separar el RNA de los otros componentes celulares. Se agitó manualmente por 15 segundos y luego se procedió a incubar a temperatura ambiente por 2-3 minutos, se centrifugó a 14800 x g por 5 minutos a 4°C para lograr la separación de las diferentes fases: la fase inferior que contiene el DNA, la fase superior acuosa el RNA y en la interfase las proteínas.

Se recuperó el sobrenadante, se precipitó el RNA con 500 uL de isopropanol frío, se agitó manualmente por 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 14800 x g por 10 minutos a 4°C, y después de descartar el sobrenadante, se lavó el pellet, con 500 uL de etanol frío al 70% (p/v H₂O tratada con DEPC (Sigma), inhibidor de RNAsas), se agitó y se centrifugó a 5800 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y el pellet en el fondo del tubo se secó ligeramente en concentrador al vacío a 60 °C por 30-60 segundos.

Luego se suspendió en 10 uL de agua estéril tratada con DEPC se incubó por 10 minutos a 55°C y finalmente se mantuvo durante 60 minutos en hielo. Con el objetivo de eliminar la posible contaminación con DNA genómico, el RNA total se trató con rDNAsa1 (DNA-free Ambion. Inc, Austin, TX, EEUU) en presencia de buffer de DNAsa1 y de RNAsa out (Ambion) por 25 minutos a 37°C. Luego, se agregaron 4 uL de reactivo de inactivación de DNAsa1, se incubó a temperatura ambiente (con mezcla ocasional) por 2 minutos, se centrifugó a 10000 x g por 2 minutos a 4°C y se

transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregaron 10 uL de agua DEPC al pellet, y se repitió este paso para recuperar más RNA.

Las muestras se cuantificaron en espectrofotómetro Nanodrop® (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer, Wilmington, EEUU), determinándose la absorbancia a 260 nm, 280 nm, la razón 260/280 y la concentración en ng/dL. La absorbancia a 260 nm indica la concentración de RNA y a 280 nm la contaminación con proteínas. Se utilizaron sólo las muestras con razón 260/280 > 1,80. La integridad del RNA se confirmó por electroforesis en agarosa-formaldehído al 1,2 % (p/v). El RNA total se guardó a -80°C hasta su uso.

4.6.2. Síntesis de cDNA.

Procedimiento: El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 2 µg de RNA total purificado, los que se incubaron con 0,5 uL de random primer (150 ng/ul, Invitrogen), a 70°C por 10 minutos seguida de una incubación en hielo por al menos 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 8 uL de mezcla de reacción para la transcripción reversa (4 uL de 5X buffer Revertaid, 2 uL de dNTP 10 mM, 1 uL de RNase Out, 1 uL de H₂O DEPC), se agitó en vórtex, se precipitó por spin, y se incubó a 25°C en termociclador por 5 minutos. Luego se agregó 1 uL de la enzima transcriptasa reversa RevertAid H Minus M-Mul V (Fermentas) por tubo y se inició el programa de transcripción reversa (10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, 10 minutos 70°C finalizando a 4°C). Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo y se guardaron a – 80°C hasta su uso.

4.6.3. Técnica de Amplificación en Cadena de la Polimerasa.

RT-PCR: La amplificación génica de MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3, e IL-12 se realizó con 1 ul de cDNA utilizando partidores específicos para cada gen de interés (Tabla 2) en las condiciones indicadas en la Tabla 3. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1,0 % (p/v) con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). La densidad óptica de las bandas se capturó con la cámara KODAK Eletrophoresis Documentation y Análisis System (EDA 290) y evaluada con el programa computacional Carestream 5.0 Image Analysis. Cada gen amplificado se normalizó con la amplificación del gen constitutivo de rRNA 18S.

Tabla 2. Partidores específicos de genes que amplifican para ligandos de NKG2D e Interleuquina.

Nombre	Secuencia	Gen amplificado
MICA-Forward	5`-TGTAAGAAGAAAACATCAGCT-3`	MICA
MICA-Reverse	5`-ATAGGTCAGGAAACTGAGGCAC-3`	
MICB-F	5`-TCACGGGTTTCATTTCAGTTGGC-3`	MICB
MICB-R	5`-ACAGCACCATGAGGTTGTAACG-3`	
ULBP1-F	5`-ACGGAGCTCCAGGTCTACAATG-3`	ULBP1
ULBP1-R	5`-GTGGTTCAGGTCTGGACTTAGG-3`	
ULBP2-F	5`-CTCTCCTTCCATCAAGTCTC-3`	ULBP2
ULBP2-R	5`-TGGTCCAGGTCTGAACTTAG-3`	
ULBP3-F	5`-CCGACGCTCACTCTCTCT`-3	ULBP3
ULBP3-R	5`-TGTTTTCCCCAGGCATCTGT-3`	
IL-12-F (p40)	5`-CCAAGAACTTGCAGCTGAAG-3`	IL-12
IL-12-R (p40)	5`-TGGGTCTATTCCGTTGTGTC-3`	

Tabla 3. Condiciones para amplificación génica por RT-PCR.

GEN	Nº Ciclos	Temperatura	Concentración Mg⁺⁺ (uM)	Tamaño
MICA	31	58° C	2,0 uM	248 bp
MICB	34	58° C	3,0 uM	166 bp
ULBP-1	34	58° C	1,0 uM	161 bp
ULBP-2	34	58°C	3,0 uM	186 bp
ULBP-3	34	57° C	3,0 uM	198 bp
IL-12p40	34	58° C	2,5 uM	355 bp

4.6.4. Inmunohistoquímica (IHQ).

Procedimiento: Se realizó técnica inmunohistoquímica para evaluar la presencia y localización de los ligandos de NKG2D: MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3 y para las citoquinas IL-12 e IL-10 en cortes de tejido endometrial de 5 µm incluidos en parafina. El material de estudio se obtuvo de endometriosis eutópicas de mujeres con y sin endometriosis en las distintas etapas del ciclo menstrual. Los cortes se desparafinaron con 2 lavados secuenciales con xilol de cinco minutos cada uno y se hidrataron con una batería de alcoholes (100%, 90%, 85%, 70%, 50%) y agua destilada por 5 minutos cada uno. Posteriormente, se colocaron en una vaporera a 100°C con Citrato de Na⁺ (10 mM, pH 6,0) por 30 minutos para exposición de los sitios antigénicos. Los cortes se dejaron enfriar al menos durante 1 hora y se lavaron en H₂O destilada, quitando el exceso de líquido sin dejar que se secan.

Bloqueo: Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se agregó peróxido de hidrógeno al 3% diluido en H₂O destilada por 15 minutos a temperatura ambiente.

Se bloquearon los sitios de unión inespecífica con PBS-BSA al 2% durante 45

minutos a temperatura ambiente.

Anticuerpos: Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron con los distintos anticuerpos (50-100 μ L de las diluciones de los anticuerpos dependiendo del tamaño del corte) (Tabla 4) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda; como control negativo el anticuerpo se reemplazó por PBS-BSA al 1%. Luego se lavaron con H₂O destilada durante 5 minutos, y con PBS por 5 minutos. A continuación se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos a temperatura ambiente, y nuevamente se lavaron con H₂O destilada seguido de lavado con PBS por 5 minutos.

Revelado: Se aplicó estreptavidina-peroxidasa (kit Vector) por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las placas con H₂O destilada por 5 minutos, y PBS por 5 minutos y luego se agregó el cromógeno Diaminobencidina [DAB] (kit Cromógeno DAB + Sustrato, Vector) (20 μ L para 1 mL) durante 8 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavaron con H₂O destilada durante 5 minutos, se eliminó el exceso de agua, y se dejaron secar las placas.

Contraste y Montaje: Los cortes se tiñeron con hematoxilina de Harris durante 40 segundos, se lavaron en abundante agua corriente, se dejaron en agua destilada durante 5 minutos, se secaron para luego aplicar medio de montaje Entellan (Merck).

Evaluación: El análisis de la positividad de las muestras se realizó en un microscopio óptico Olympus (CRX) con cámara adosada con la que se obtuvieron 12 fotografías por corte de endometrio con el programa ImageProPlus v6.3, utilizando como herramienta la Intensidad de Densidad Óptica (IOD) promedio para la evaluación semicuantitativa.

4.6.5. Citometría de Flujo.

Para evaluar la expresión de ligandos de NKG2D: MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2, y ULBP-3 se realizó citometría de flujo con células estromales (ESC) y epiteliales (EEC) de cultivo de primer pasaje de endometrio eutópico, las cuales se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido con solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en SFB como se indicó en 4.5.

Se descongelaron las células, colocando los viales en baño termostático a 37°C por 1 minuto. Luego se traspasó el contenido a un tubo cónico completando a 10 mL de volumen total con medio de cultivo y se centrifugó a 400 x g por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de medio de cultivo y se les realizó recuento a las células endometriales con tinción vital (Azul Tripán), obteniendo en todos los casos recuentos sobre 70% de células vivas. Se cultivaron las células en frascos de 75 cm² hasta llegar a confluencia, momento en que las células endometriales adherentes se recuperaron del frasco de cultivo a través de raspado suave con rastrillo.

Luego se transfirieron las células a un tubo de 15 mL y se agregaron 10 mL de medio de cultivo DMEM con 10% de SFB. Se mantuvieron entre 25 y 37°C, hasta el momento de realizar el protocolo de citometría. Se centrifugaron las células a 400 g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se fijó con paraformaldehído (PFA) al 2% (p/v) en PBS, manteniendo la concentración de 100.000 células/100 µL de fijador. Las suspensiones celulares se transfirieron a placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo en V (100.000 células/pocillo), y se incubaron en hielo por 30 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS-SFB al 2% agregando 200 µL de solución de lavado por pocillo seguido de centrifugación a 400 x g por 3 minutos a 4°C, se

eliminó el sobrenadante por inversión de la placa y se agregaron, por separado, los anticuerpos monoclonales primarios purificados dirigidos contra los ligandos MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3.

Incubación con Anticuerpo Primario:

Se agregaron 25 μ L de cada anticuerpo primario por pocillo (dilución 1/25) (Tabla 4) y se incubaron las células por 40 minutos a temperatura ambiente. Luego de agregar la solución de lavado y centrifugar a 400 g por 3 minutos a 4°C (3 veces) se eliminó el sobrenadante y se agregó el anticuerpo secundario, un anti-IgG de ratón conjugado a FITC (dilución 1/50), colocando 25 μ L por pocillo incubando 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Luego de 3 lavados y eliminación del sobrenadante, se resuspendieron las células en 100 μ L de PFA al 2%. Finalmente, se analizaron las suspensiones celulares usando el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences - Immunocytometry Systems), los datos se adquirieron con el programa CellQuest (ambos de Becton-Dickinson, EEUU) y se analizaron con el software FlowJo v8.7 (Tree Star, Inc, EEUU). Las células muertas se excluyeron de acuerdo a sus características de tamaño [side scatter (SSC)] y granularidad [forward scatter (FSC)]. Se recolectaron y analizaron un promedio de 20.000 eventos por muestra.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en IHQ y Citometría de Flujo:

Anticuerpo	Características
Anti-human MICA	R&D Systems. Ac. Monoclonal de ratón. Nº Cat. MAB1300. Dilución IHQ: 1/100.
Anti-human MICB	R&D Systems. Ac. Monoclonal de ratón. Nº Cat. MAB1599. Dilución IHQ: 1/100.
Anti-human ULBP-1	R&D Systems. Ac. Monoclonal de ratón. Nº Cat. MAB1380. Dilución IHQ: 1/100.
Anti-human ULBP-2	R&D Systems. Ac. Monoclonal de ratón. Nº Cat. MAB1298. Dilución IHQ: 1/100.
Anti-human ULBP-3	R&D Systems. Ac. Monoclonal de ratón. Nº Cat. MAB1517. Dilución IHQ: 1/100.
Anti-human IL-10	Abcam. Ac. Policlonal de conejo. Nº Cat. Ab34843. Dilución IHQ: 1/550.
Anti-human IL-12	R&D Systems. Ac. Policlonal de cabra. Nº Cat. AF-219-NA. Dilución IHQ: 1/100.

4.6.6. Análisis hormonal:

El estradiol, progesterona, testosterona y androstenediona se midieron por radioinmunoensayo (RIA) competitivos y específicos para cada uno de ellos (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA). Los CV intraensayos fueron 4,1%, 4,8%, 5,3% y 4,2% e interensayo de 6,7%, 7,2%, 8,1% y 8,9%, respectivamente.

4.7. Análisis estadístico y tamaño muestral:

El tamaño muestral para este estudio se calculó empleando un alfa de 0,05 y un poder estadístico de 80% (beta=0,20). Se consideraron desviaciones estándar del re-

porte de Kyama et al. (2008) con el interés de establecer una diferencia entre las medias de los grupos de al menos 11%. En estas condiciones, el tamaño muestral necesario por grupo resultó ser de 4 sujetos. Como los grupos en estudio son dos y el ciclo menstrual tiene 4 categorías, el tamaño muestral se estimó en 32 sujetos totales, 16 para el grupo control y 16 para el grupo con endometriosis.

Todos los datos fueron analizados con el software estadístico Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). Para las variables de tipo continuo, los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante el tests de Mann-Whitney U o de Kruskal-Wallis H seguido del test de Dunn, para una distribución no paramétrica (previamente determinada según el test de Kolmogorov-Smirnoff). El valor de p inferior al 5% ($p < 0,05$) fue considerado como significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Características clínicas, antropométricas y hormonales

La Tabla 5 muestra la concentración plasmática de hormonas esteroidales en ambos grupos de mujeres en una muestra sanguínea obtenida previo a la cirugía, además, los rangos y promedios de edad e índice de masa corporal. Solamente el 28% de las mujeres con endometriosis presentaron paridad a diferencia del 78% en las controles. Los estadios del grado de endometriosis se distribuyeron en forma relativamente similar con un ligero predominio de endometriosis de mayor severidad.

Tabla 5. Antropometría, concentraciones hormonales y características de la endometriosis

	Sujetos			
	Endometriosis (n=40)		Control (n=41)	
	Fases del Ciclo Menstrual			
	Proliferativa (Folicular; n=10)	Secretora (Lútea; n=30)	Proliferativa (Folicular; n=10)	Secretora (Lútea; n=31)
Estradiol (pg/mL)	102 ± 19	124 ± 12	100 ± 25	98 ± 13
Progesterona (ng/mL)	1,1 ± 0,2	7 ± 0,6	2,5 ± 1,0	4,9 ± 0,8
Androstenediona (ng/mL)	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,2	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,1
Testosterona (ng/mL)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Edad (años)	34,0 ± 6,0 (22-46)		38,1 ± 5,8 (25-45)	
IMC (Kg/m ²)	24,9 ± 1,0 (18-38)		26,9 ± 1,0 (19-37)	
Paridad (uno o más hijos)	28%		78%	
Estadios de la Endometriosis (ASRM, 1997)	I/II (mínimo/leve)	45%		
	III/IV (moderado/severo)	55%		

En una muestra única de sangre se determinaron las concentraciones plasmáticas como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como promedios ± error estandar.

Valores normales: Androstenediona : 0,85-2,75 ng/mL y Testosterona : <0,60 ng/mL.

Fase Folicular: Estradiol 30-100 pg/mL, Progesterona: 0,15-0,7 ng/mL. Periovulatoria: Estradiol : >200 pg/mL;

Fase Lútea : Estradiol : 70-300 pg/mL ; Progesterona : 2-12,5 ng/mL.

5.2. Detección de ligandos del receptor de activación NKG2D de células Natural Killer en tejido endometrial *ex vivo*

5.2.1 Niveles de mRNA de MICA y MICB

Los niveles del mRNA MICA y MICB fueron detectados en los endometrios *ex vivo* de mujeres controles y pacientes durante el ciclo menstrual.

La expresión de MICA aumentó 80% en la fase secretora media y 100% en la tarde comparado con la fase proliferativa solamente en el grupo control y aunque en endometriosis también se detectó el mRNA de estos ligandos con un patrón similar, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes etapas del ciclo menstrual (Figura 1A).

En el grupo control, el nivel del mRNA de MICB fue constante en las distintas etapas del ciclo menstrual. Por el contrario, en endometriosis los niveles de mRNA de MICB aumentaron en la etapa secretora inicial disminuyendo fuertemente en la fase secretora tarde al compararlo con la fase proliferativa ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias entre ambos grupos de endometrios estudiados (Figura 1B).

5.2.2. Presencia y localización de la proteína de MICA y MICB

La proteína de MICA y MICB fue detectada por IHQ en ambos compartimientos tanto para el grupo control como de endometriosis (Figura 2). La marca positiva café fue homogénea.

NIVELES mRNA MICA Y MICB

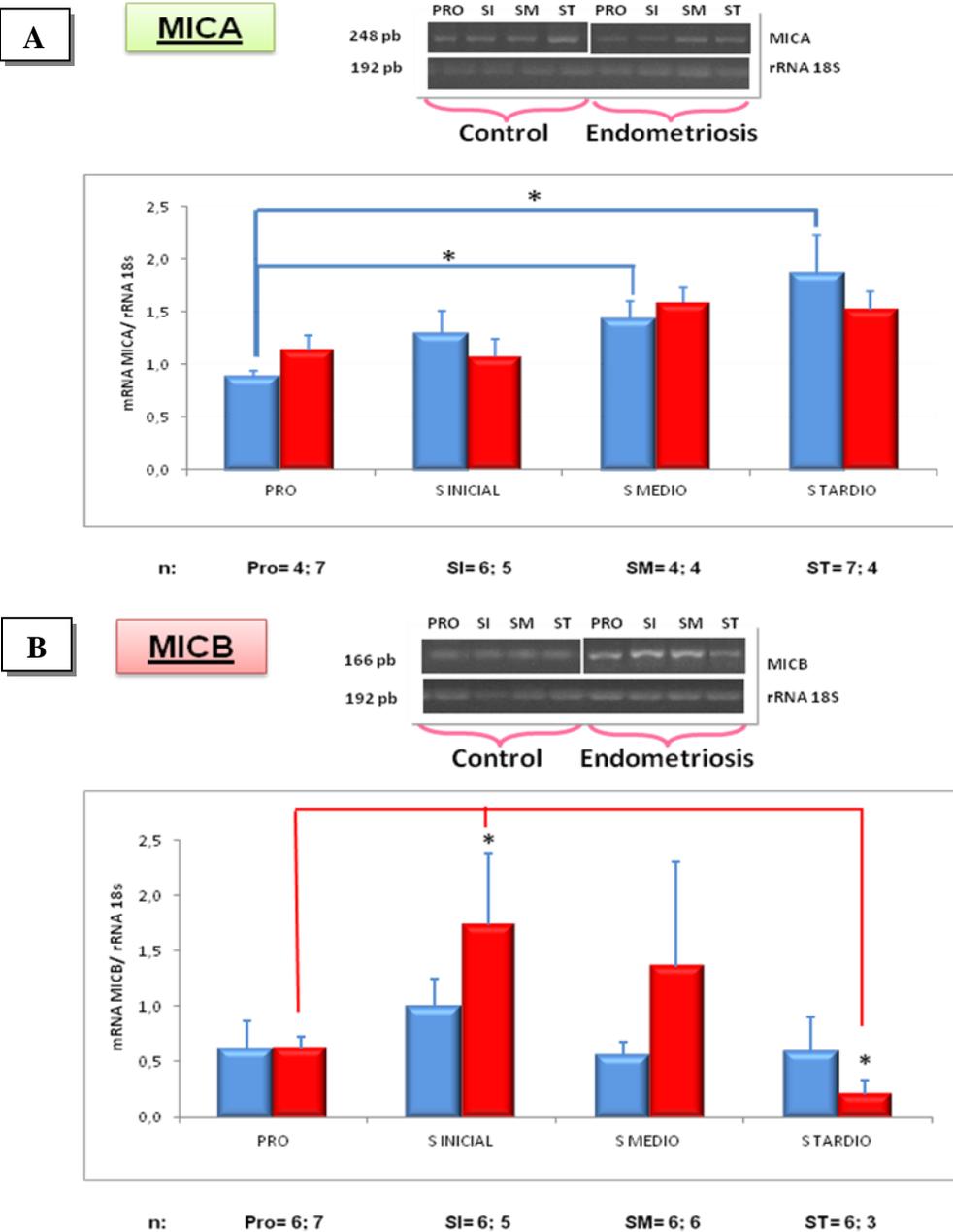


Figura 1. Aumento del nivel de mRNA de MICA (A) en endometrio control y variación de MICB (B) en endometrio eutópico de endometriosis durante el ciclo menstrual. Se muestran gels representativos de las amplificaciones de los genes MIC y rRNA 18S y las gráficas de los resultados obtenidos de endometrios de mujeres con y sin endometriosis después de normalizarlos con rRNA 18S. MICA aumentó significativamente durante el ciclo menstrual en el grupo control, en tanto, MICB, aumentó en la etapa secretora inicial disminuyendo marcadamente en la etapa tardía solamente en el grupo de endometriosis. El n muestral se indican en cada figura. De izquierda a derecha las barras representan las distintas fases del ciclo menstrual (PRO= proliferativo; S= secretor). (Barras azules: control; barras rojas: endometriosis). *p < 0,05.

DETECCION PROTEICA DE MICA y MICB EN ENDOMETRIO

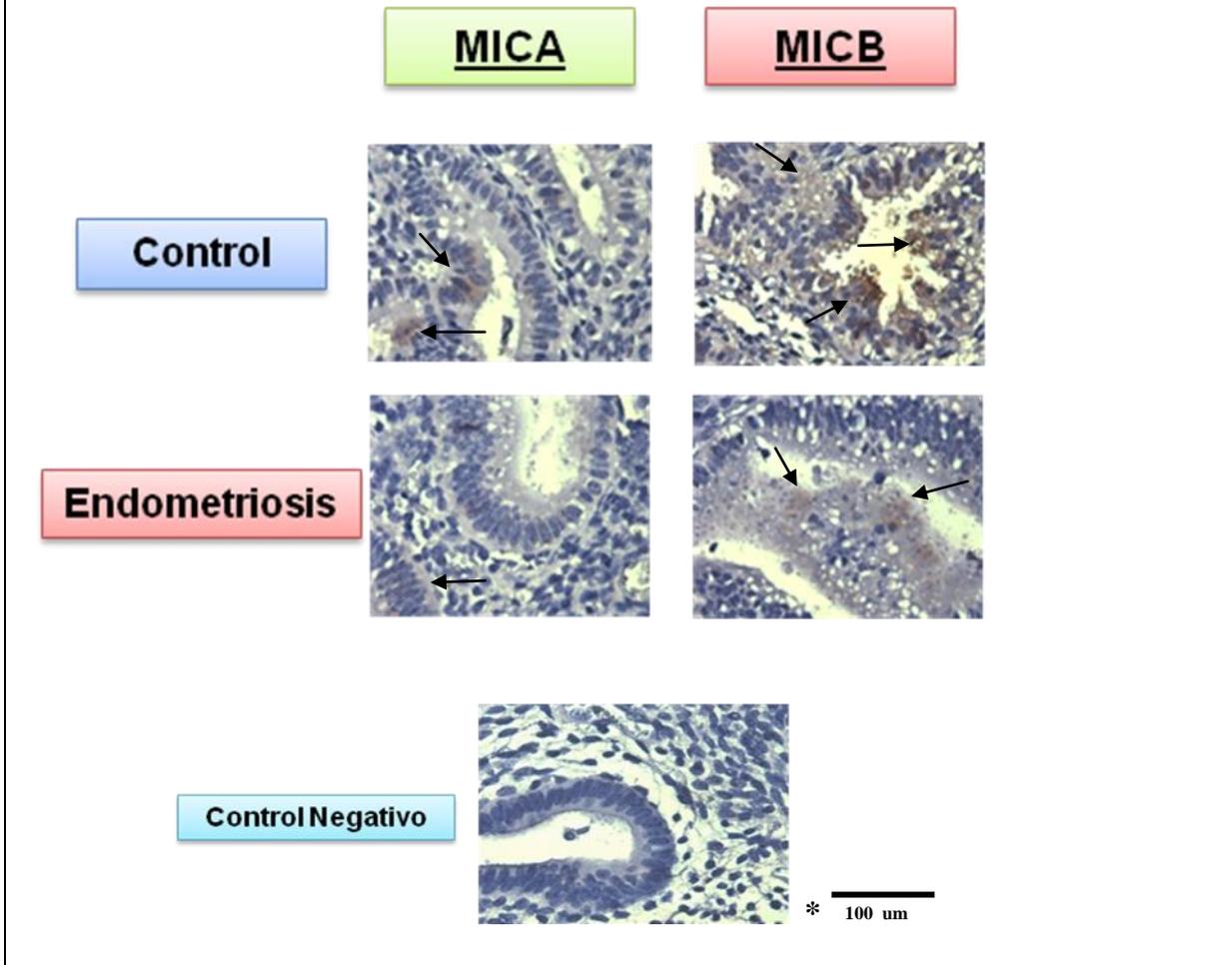


Figura 2. **Presencia de MICA y MICB en estroma y epitelio de endometrio control y eutópico de endometriosis en fase secretora.** Visualización de la presencia de la inmunotinción positiva para MICA y MICB en los compartimientos epitelial y estromal en endometrios *ex vivo* de fase secretora en grupo control y de endometriosis. La inmunotinción fue homogénea y de ubicación citoplasmática. Flechas negras indican marca positiva. Microfotografía 400x. *: Barra de 100 um

5.2.3 Niveles de mRNA de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3

Los niveles de mRNA de ULBP-1 fueron constantes y reducidos durante el ciclo menstrual en los endometrios de controles y pacientes y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Figura 3A).

Con respecto a ULBP-2, sus niveles de mRNA aumentaron 100% desde la fase proliferativa hacia la tardía en ambos grupos de endometrio ($p < 0,05$) sin mostrar diferencias significativas entre ellos (Figura 3B).

Para ULBP-3, la expresión fue constante a través del ciclo menstrual en ambos grupos, observándose una disminución en la fase secretora media sólo en el control, siendo esto significativo al compararlo con el grupo de endometriosis ($p < 0,05$) (Figura 4).

5.2.4. Presencia y localización de la proteína de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3

La proteína de los ligandos ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 de NKG2D fue detectada por IHQ en el endometrio eutópico durante el ciclo menstrual en ambos grupos de estudio (Figura 5).

La inmunotinción positiva fue de aspecto homogéneo en el caso de ULBP-1 y ULBP-2. En el caso de ULBP-3, las células positivas tenían marca de aspecto granular. En los 3 casos la marca mostró ser citoplasmática.

NIVELES mRNA ULBP-1 y ULBP-2

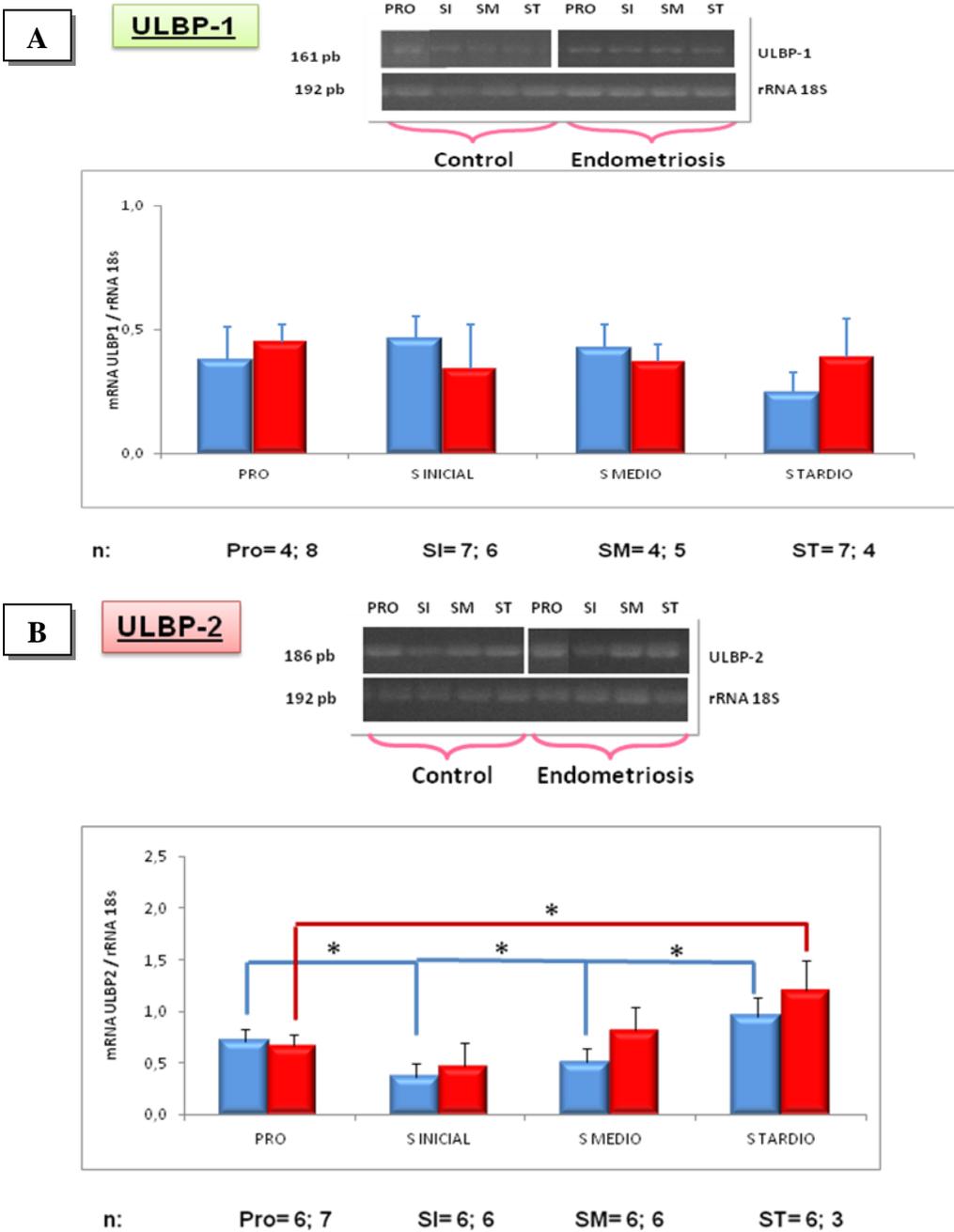


Figura 3. El nivel de mRNA de ULBP-2 (B) aumenta en la fase secretora tardía. ULBP-1 (A) no varía durante el ciclo menstrual. Se muestran geles representativos de las ampliificaciones de los genes ULBP y de rRNA 18S y las gráficas de los resultados obtenidos de endometrios de mujeres con y sin endometriosis después de normalizarlos con rRNA 18S. La expresión de ULBP-2 mostró variación durante el ciclo menstrual aumentando sus niveles en la fase secretora tardía. De izquierda a derecha, las barras representan las distintas fases del ciclo menstrual (PRO= proliferativo; S= secretor inicial, medio y tardío). (Barras azules: control; barras rojas: endometriosis). *p < 0,05

NIVELES mRNA ULBP-3

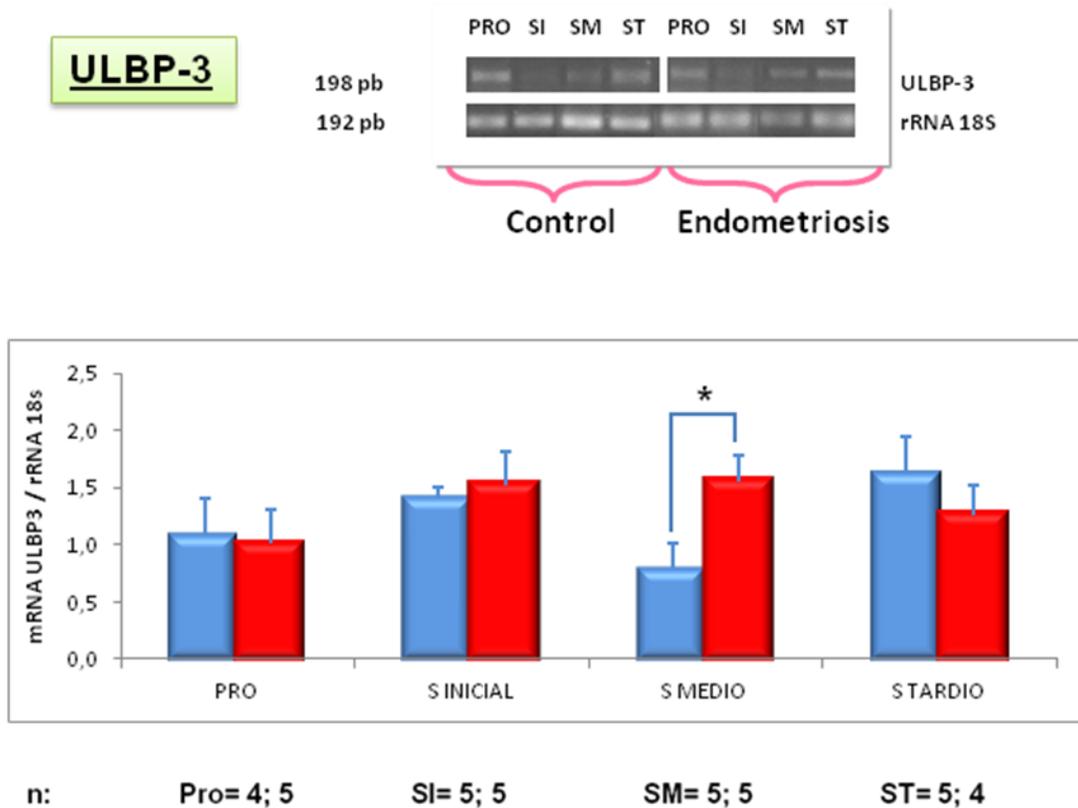


Figura 4. **El nivel de mRNA de ULBP-3 disminuye en la fase secretora media en el endometrio control.** Se muestran los geles representativos de las amplificaciones de los genes ULBP-3 y de rRNA 18S por RT-PCR y las gráficas de los resultados obtenidos de endometriosis de mujeres con y sin endometriosis después de normalizarlos con rRNA 18S. Se observó una disminución en los niveles de ULBP-3 en el grupo control en la fase secretora media, variación no observada en el grupo de endometriosis.

De izquierda a derecha las barras representan las distintas fases del ciclo menstrual (PRO= proliferativo; S= secretor inicial, medio y tardío). (Barras azules: control; barras rojas: endometriosis). *: $p < 0,05$

DETECCION PROTEICA DE ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 EN ENDOMETRIO

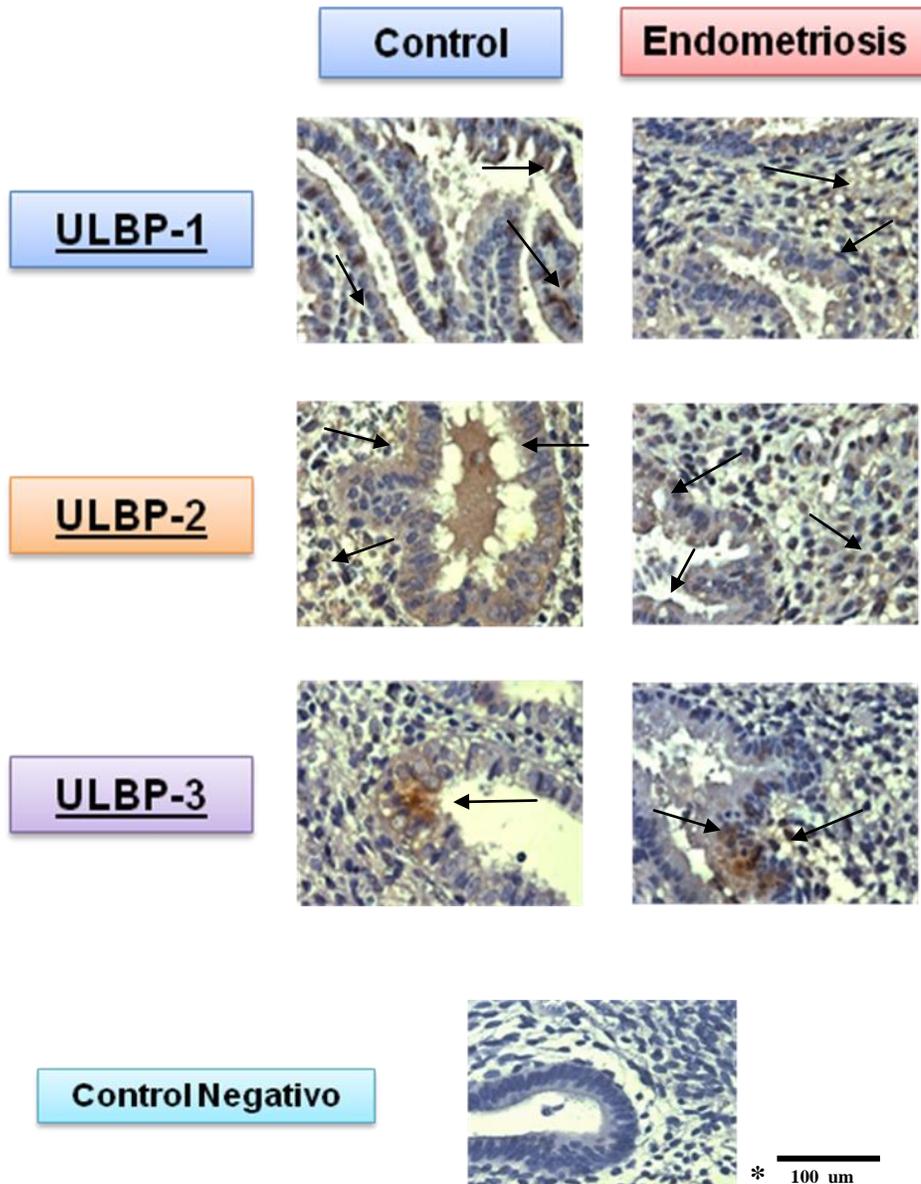


Figura 5. **Presencia de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en estroma y epitelio de endometrio control y eutópico de endometriosis.** Visualización de la presencia de inmunotinción positiva para ULBP-1, ULBP-2 y ULBP3 en los compartimientos epitelial y estromal, de grupo control y de endometriosis. Las microfotografías corresponden a endometrios en fase secretora. Flechas negras indican marca positiva. Microfotografía 400x. *: Barra de 100 um

5.3. Detección de citoquina IL-12 en endometrio eutópico *ex vivo*.

5.3.1. Nivel del mRNA de IL-12

Muy bajos niveles del mRNA de IL-12p40 fueron detectados en el endometrio control presentando un patrón constante durante el ciclo menstrual, a diferencia de los niveles observados en el endometrio de mujeres con endometriosis durante la fase secretora media que presentó un aumento de 200% al compararlo con el control ($p < 0,05$) (Figura 6).

5.3.2. Presencia y localización de la proteína de citoquina IL-12

Se detectó la proteína de IL-12 por IHQ en el endometrio eutópico durante el ciclo menstrual en el compartimiento estromal y epitelial en ambos grupos de estudio. (Figura 7). La inmunotinción de apariencia homogénea fue focal observándose en grupos de células o en células aisladas. (Figura 8).

Se evaluaron los campos con células positivas en ambos grupos en estudio y se observó en el grupo control un aumento en la presencia de campos con presencia de células positivas en la fase secretora tardía, siendo un 300% mayor al compararlo con el grupo de endometriosis. (Figura 9).

NIVELES mRNA IL-12 p40

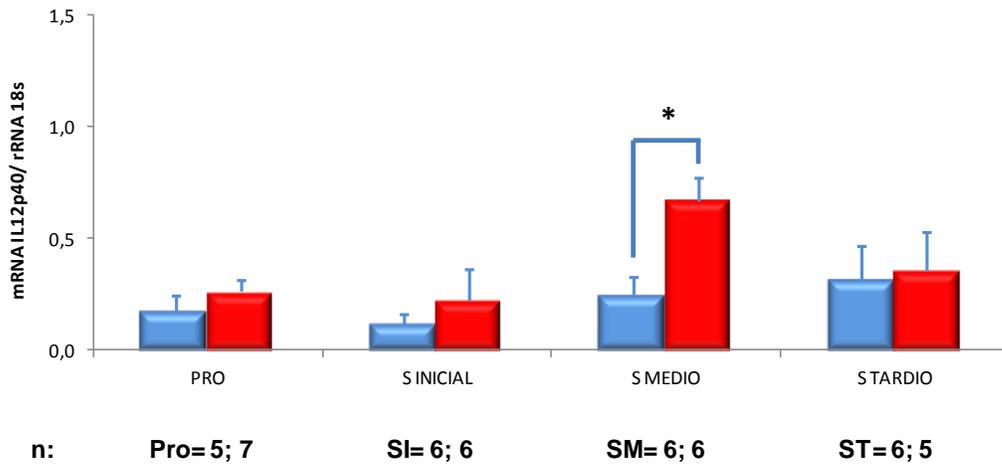
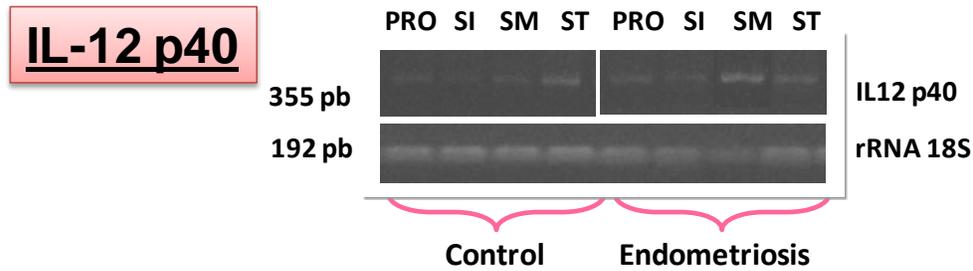


Figura 6. **El nivel del mRNA de IL-12 aumenta en endometrio eutópico de endometriosis en fase secretora.** Se muestra gel representativo de las amplificaciones de los genes IL-12 y de rRNA 18S por RT-PCR y las gráficas de los resultados obtenidos en endometrios de mujeres con y sin endometriosis después de normalizarlos con rRNA 18S. Se observó aumento significativo en los niveles de la citoquina en endometrios del grupo endometriosis de fase secretora media al compararlo con el grupo control.

El n muestral se indican en cada figura. De izquierda a derecha las barras representan las distintas fases del ciclo menstrual (PRO= proliferativo; S= secretor). (Barras azules: control; barras rojas: endometriosis). *p < 0,05.

DETECCION PROTEICA DE IL-12 EN ENDOMETRIO EUTOPICO

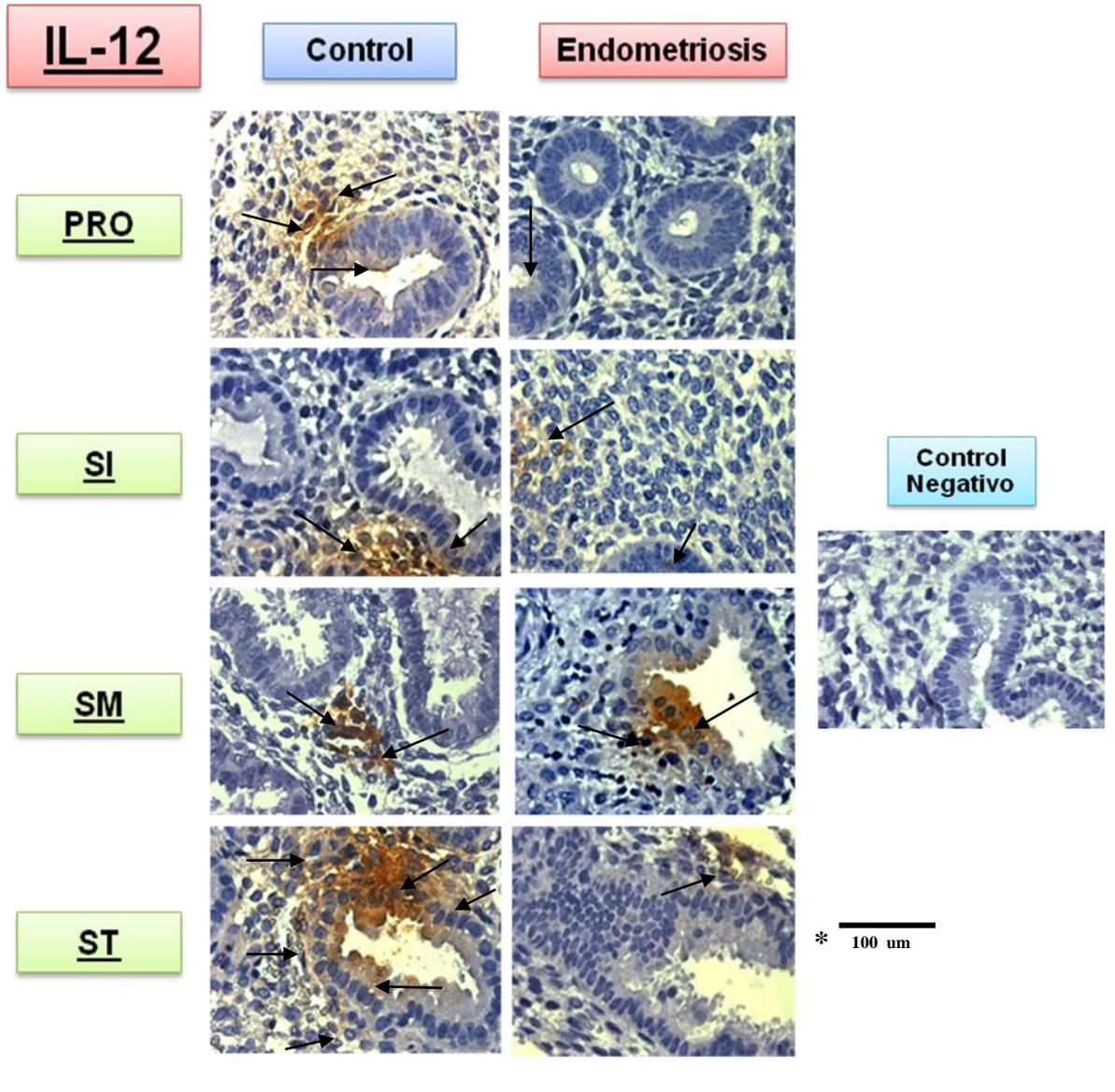


Figura 7. **Presencia de IL-12 en estroma y epitelio de endometrio control y eutópico de endometriosis.** Visualización de la presencia de inmunotinción positiva para IL-12 en los compartimientos epitelial y estromal de los grupos control y de endometriosis. Las microfotografías corresponden a endometrios a lo largo del ciclo menstrual. La tinción es homogénea y ubicada en el citoplasma. Flechas negras indican marca positiva Microfotografía 400x. *Barra de 100 um

DETECCION PROTEICA DE IL-12 EN ENDOMETRIO EUTOPICO

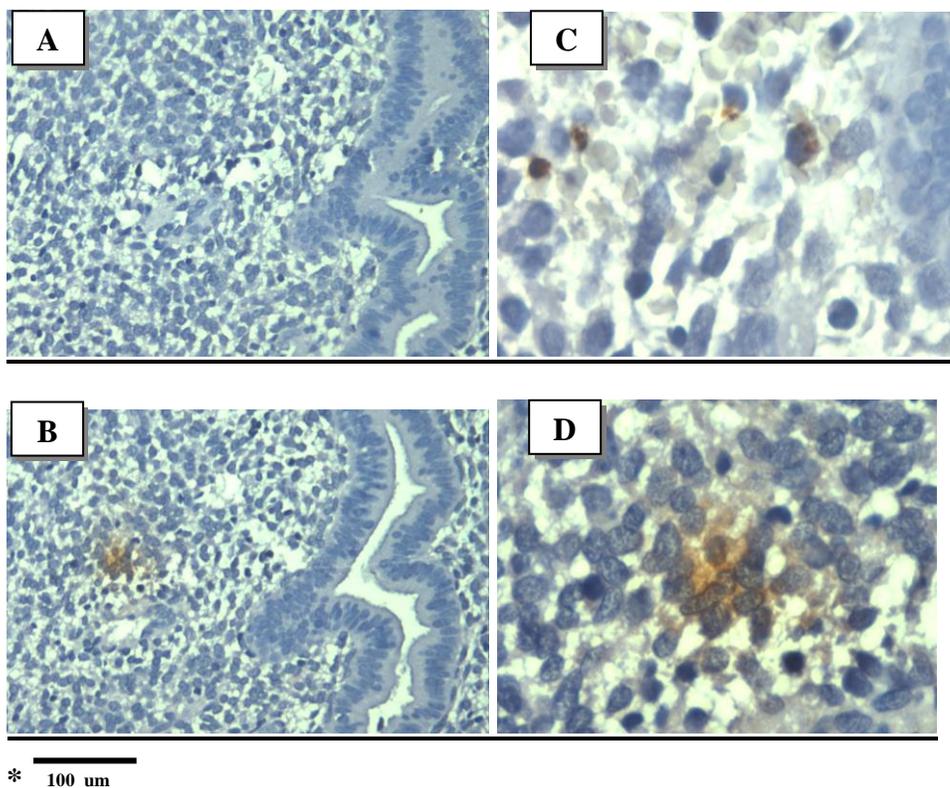


Figura 8. Presencia de IL-12 en células del estroma de endometrio eutópico.

(A) Control Negativo. (B) Presencia de inmunotinción positiva para IL-12 en un grupo de células localizadas en el estroma endometrial; corte seriado de (A). (C) Visualización con mayor aumento de células aisladas positivas (Microfotografía 1000x). (D) Amplificación del grupo de células positivas de la microfotografía (B)

Amplificación A y B: (200x); C y D: (1000x) *: Barra de 100 um.

DETECCION PROTEICA DE IL-12 EN ENDOMETRIO EUTOPICO

IL-12

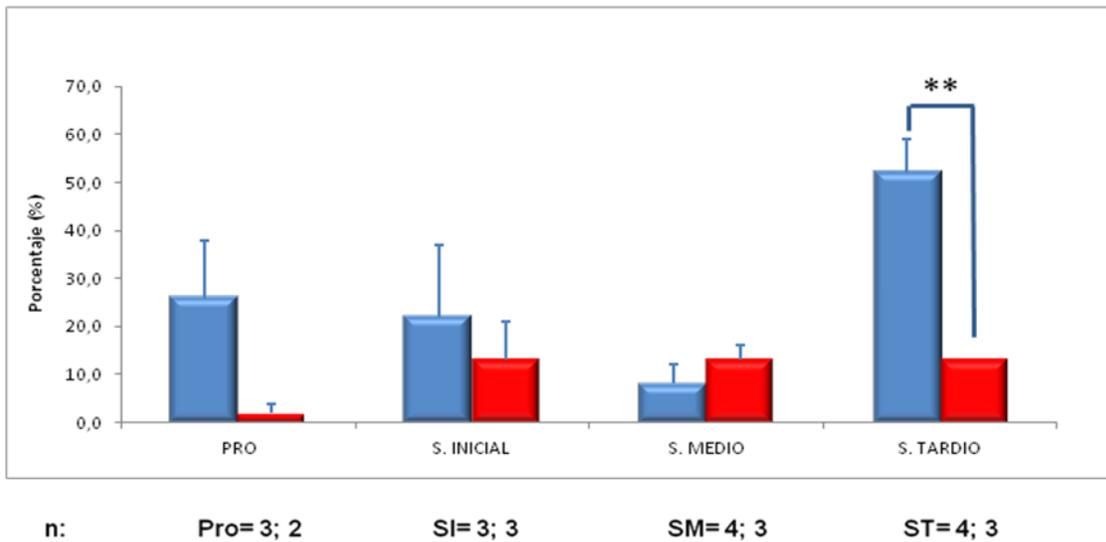


Figura 9. **El porcentaje de células positivas para IL-12 aumenta en fase secretora tardía en el endometrio control.** La grafica muestra el cálculo de los campos positivos en el grupo control y de endometriosis. Se observó un marcado aumento en la cantidad de células positivas en el grupo control en la fase secretora tardía, lo cual no se vio en el grupo con endometriosis. El n muestral se indica en la figura. De izquierda a derecha las barras representan las distintas fases del ciclo menstrual (PRO=proliferativo; S=secretor). (Barras azules: control; barras rojas: endometriosis). **p < 0,005

5.4. Detección de citoquina IL-10 en endometrio eutópico *ex vivo*.

5.4.1. Presencia y localización de la proteína de citoquina IL-10

El mRNA de IL-10 no amplificó en ninguna de las condiciones utilizadas en los endometrios obtenidos de mujeres con y sin endometriosis, por lo que no fue posible su análisis en esta tesis.

La proteína de la citoquina IL-10 se localizó en los compartimentos epiteliales y estromales a través del ciclo menstrual en endometrios de mujeres controles y con endometriosis teniendo una mayor intensidad en el epitelial que en el estromal. (Figura 10). La marca resultó ser homogénea y citoplasmática, también se observó positividad en células del endotelio.

El análisis de la positividad se realizó en 12 fotografías por endometrio con el programa ImageProPlus v6.3, utilizando como herramienta la Intensidad de Densidad Óptica (IOD) para la evaluación semicuantitativa.

No se encontró diferencia significativa en las células epiteliales controles o de las pacientes a lo largo del ciclo menstrual; sin embargo, el IOD fue menor 150% en la fase secretora media y tardía comparado al control ($p < 0,005$). (Figura 11A).

En las células estromales, se observó un incremento del IOD para IL-10 hacia la fase secretora tardía en el grupo control; por el contrario, las células estromales de endometriosis no modificaron el patrón de IOD durante el ciclo menstrual. Al comparar ambos grupos se encontró una diferencia de 131% y 288% mayor en las fases secretoras media y tardía del grupo de endometriosis comparado al control ($p < 0,0001$). (Figura 11B).

DETECCION PROTEICA DE IL-10 EN ENDOMETRIO EUTOPICO

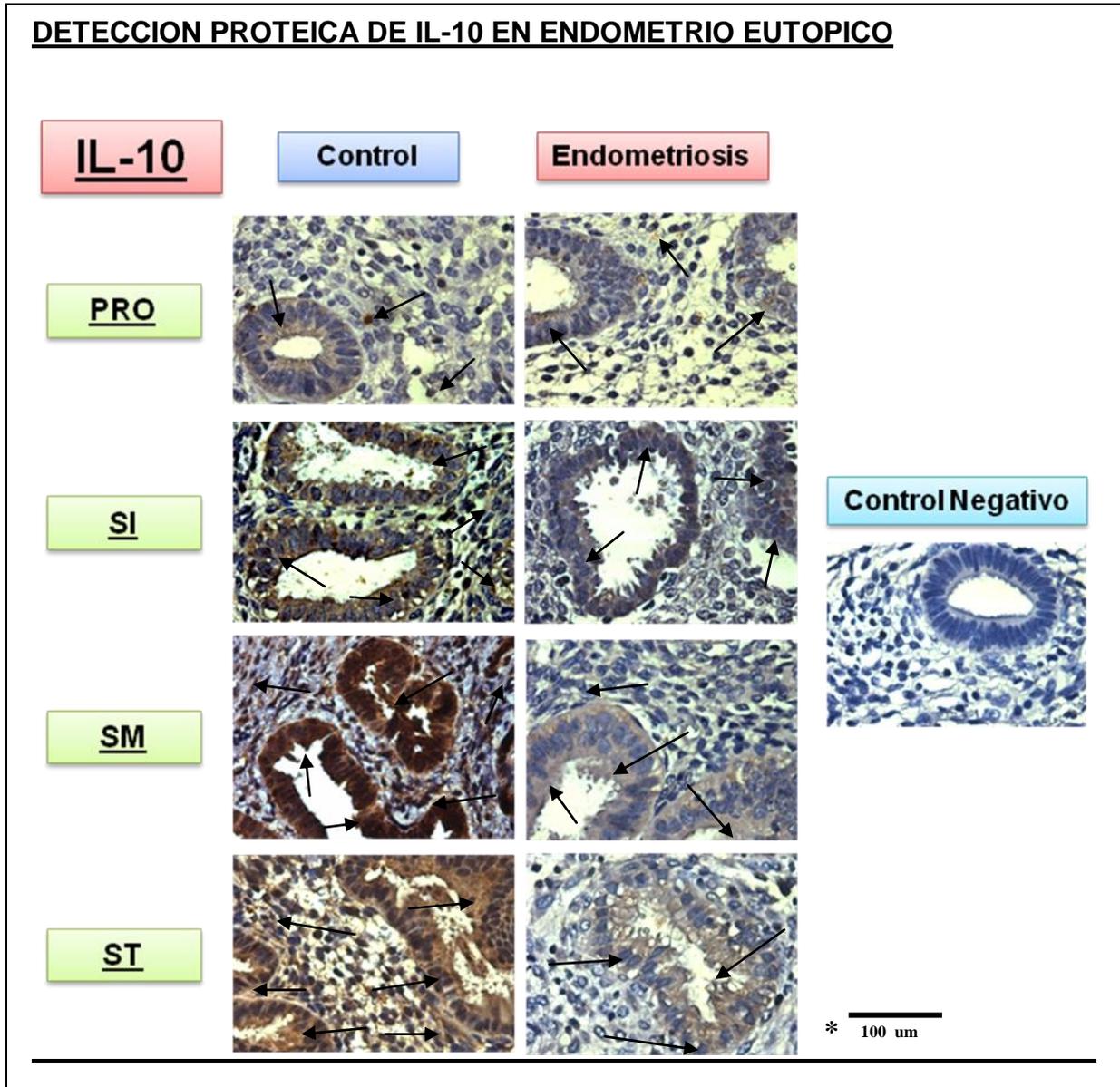


Figura 10. Presencia de IL-10 en estroma y epitelio durante el ciclo menstrual en endometrio control y eutópico de endometriosis. Localización de la inmunotinción positiva en los compartimientos epitelial y estromal. Se observó positividad en células endometriales a lo largo del ciclo menstrual en ambos grupos de estudio. Microfotografía 400x. *: Barra de 100 um

EVALUACION CELULAS POSITIVAS IL-10 EN ENDOMETRIO

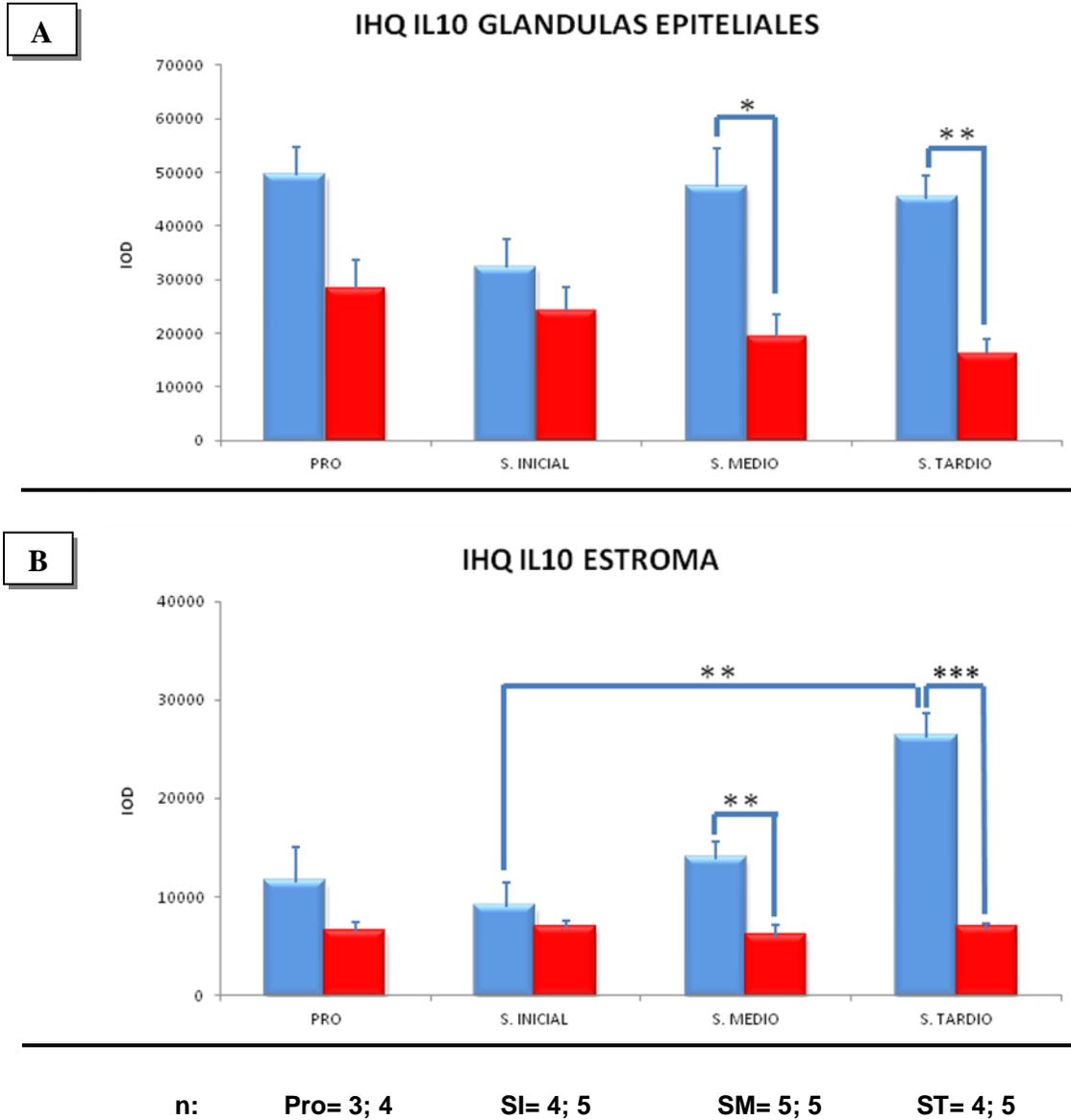


Figura 11. El IOD de IL-10 en glándulas y estroma es mayor en endometrio control que en endometrio eutópico de endometriosis en fase secretora media y tardía. Gráfica de los resultados obtenidos con el programa IImageProPlus v6.3 por evaluación con herramienta IOD en endometrios de mujeres con y sin endometriosis. (A) En las glándulas se observó positividad en los dos grupos estudiados durante el ciclo menstrual, siendo mayor la presencia en el grupo control y significativo en S. Medio y Tardío. (B) En el compartimento estromal, la proteína IL-10 fue constante en endometriosis y aumentó durante el ciclo en el grupo control. De izquierda a derecha las barras representan las distintas fases del ciclo menstrual. IOD= intensidad de densidad óptica. Pro = proliferativo; S= Secretor. (Barras azules: control; barras rojas: endometriosis). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

5.5. Detección de ligandos de NKG2D en células endometriales aisladas.

5.5.1. Detección proteica de MICA y MICB por citometría de flujo

El estudio de células endometriales aisladas permitió confirmar la presencia proteica de los ligandos MICA, y MICB, tanto en células epiteliales (EEC) como en células estromales (ESC) en ambos grupos de endometrio, control y endometriosis (Figuras 12 y 13).

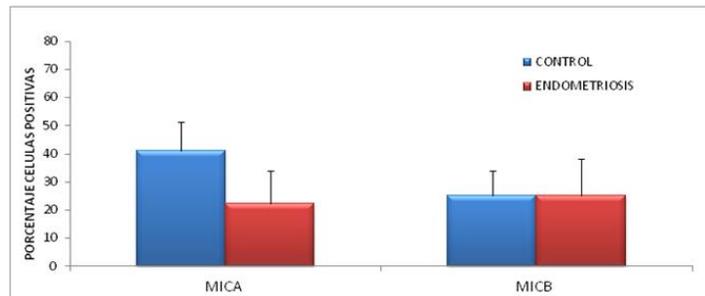
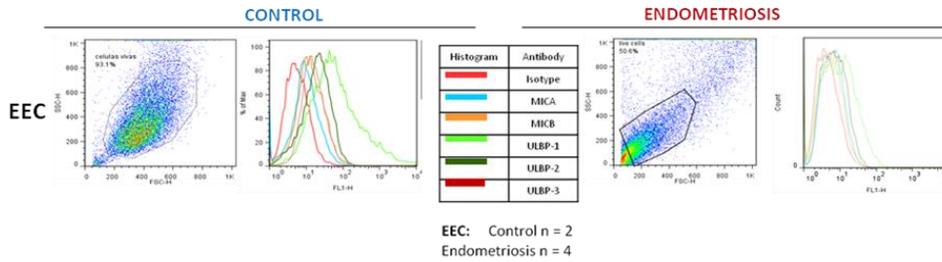
En el caso del porcentaje de células positivas para MICA y MICB, no se encontró diferencias entre los grupos en estudio en ninguno de los compartimientos celulares para las moléculas analizadas (Figura 12).

Se observó una mayor intensidad en la media de fluorescencia (MFI) en EEC controles para MICA (5,7 veces) con respecto a las EEC de las pacientes ($p < 0,005$), no encontrándose diferencia significativas en el caso de MICB (Figura 13A).

En células estromales no se encontraron diferencias para MICA y MICB en la intensidad media de fluorescencia al comparar entre los grupos de estudio (Figura 13B).

PORCENTAJE CELULAS POSITIVAS:

A) CELULAS EPITELIALES



B) CELULAS ESTROMALES

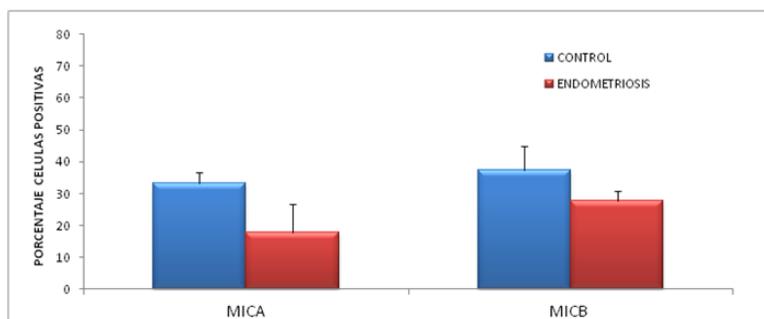
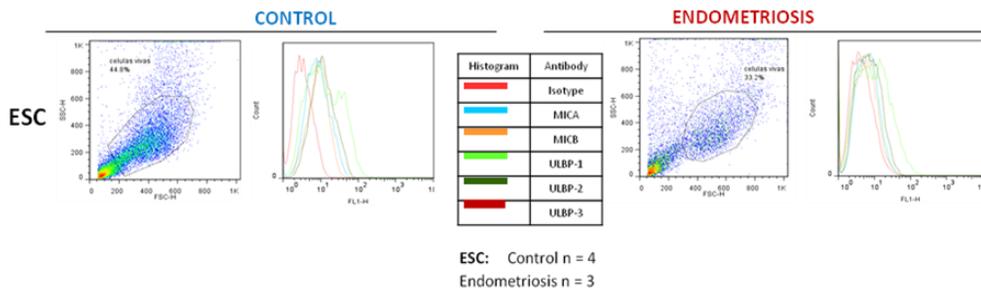
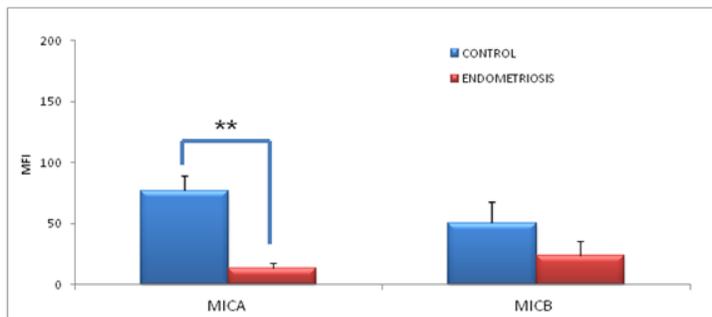
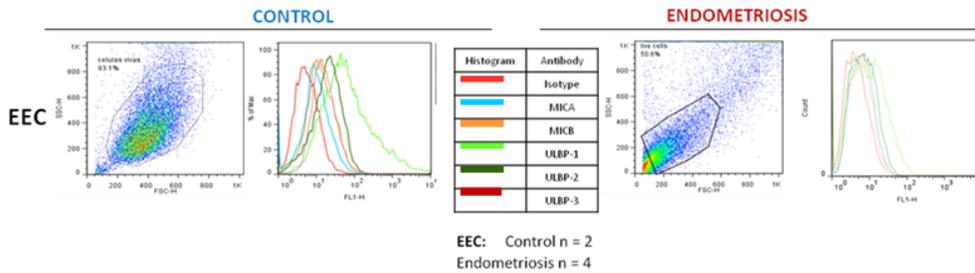


Figura 12. Porcentaje de células positivas para MICA y MICB en células endometriales. Células epiteliales (EEC) (A) y células estromales (ESC) (B) de endometrios provenientes de mujeres con (pacientes) y sin endometriosis (controles) expresan las moléculas. *Dot plots* obtenido por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos y el promedio \pm EE de los resultados de los porcentajes de células positivas correspondientes a controles y pacientes.

INTENSIDAD EN LA MEDIA DE FLUORESCENCIA (MFI):

A) CELULAS EPITELIALES



B) CELULAS ESTROMALES

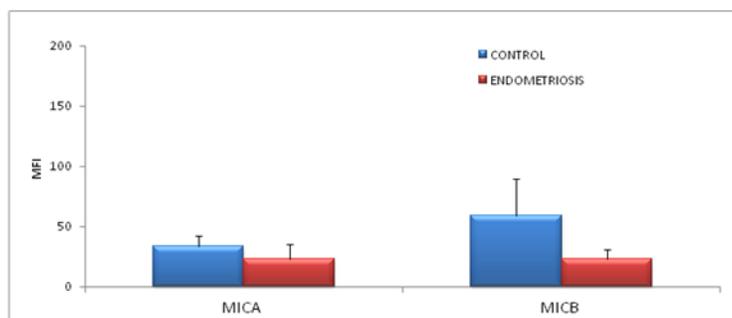
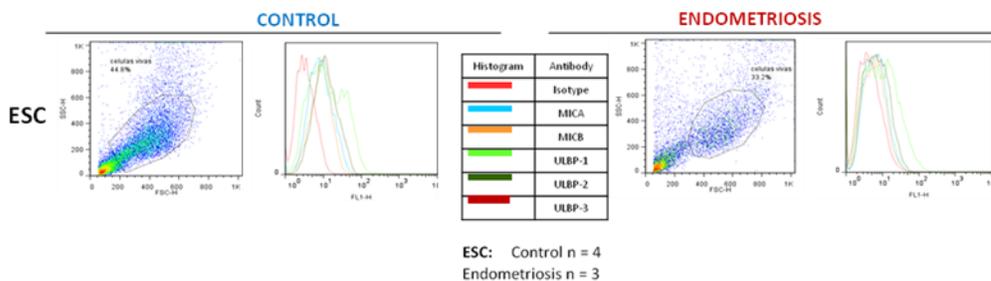


Figura 13. Las células epiteliales del endometrio de mujeres con endometriosis presentan menores niveles de MICA. Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) para MICA y MICB en células endometriales. Células epiteliales (EEC) (A) y células estromales (ESC) (B) provenientes de endometrios de mujeres con y sin endometriosis fueron incubadas con los anticuerpos indicados y evaluadas por citometría de flujo. Las células epiteliales del endometrio de mujeres con endometriosis presentan menores niveles de MICA. Se muestran los histogramas representativos y el promedio \pm EE de los resultados de los porcentajes de células positivas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

5.5.2. Niveles de mRNA de MICA y MICB

Debido a que solamente las células epiteliales (EEC) mostraron diferencia significativa entre los grupos control y pacientes por citometría de flujo, se estudio en este tipo celular los niveles de mRNA de los ligandos del receptor NKG2D MICA y MICB por RT-PCR.

La expresión del mRNA de ambos ligandos de NKG2D fue detectada en las células epiteliales de ambos grupos.

Los niveles de mRNA de MICA y MICB en las células en condición basal fueron mayores en el grupo control al compararlo con el grupo de pacientes, siendo esta diferencia significativa en el caso de MICB (200%) ($p < 0,05$) (Figura 14).

Al simular un microambiente estrogénico y/o pro-inflamatorio al incubar las células en presencia de E_2 y PGE₂, no se observaron diferencias entre ambos grupos.

Se observó que la diferencia encontrada en la condición basal entre ambos grupos se redujo en todos los ligandos, aunque no fue significativamente diferente respecto al basal correspondiente (Figura 15).

NIVELES de mRNA EN CELULAS EPITELIALES

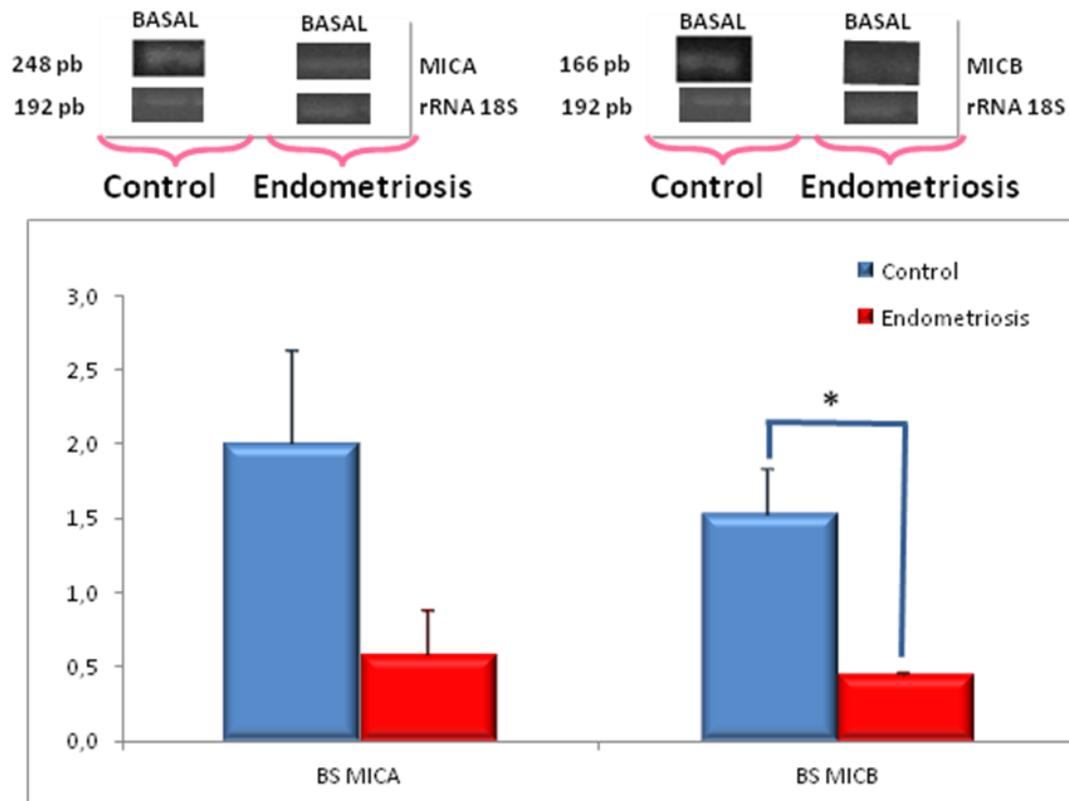


Figura 14. **El nivel de mRNA de MICB es mayor en células epiteliales aisladas de endometrio control.** Niveles de mRNA de MICA y MICB en células epiteliales aisladas por RT-PCR. Células epiteliales de endometrios de mujeres con y sin endometriosis en condición basal. Se observó presencia de ambos ligandos en células aisladas con un mayor nivel de MICB en células controles. Se muestra gel representativo. Los resultados son el promedio \pm EE de n= 3 controles y n= 3 pacientes. * $p < 0,05$.

NIVELES de mRNA EN CELULAS EPITELIALES

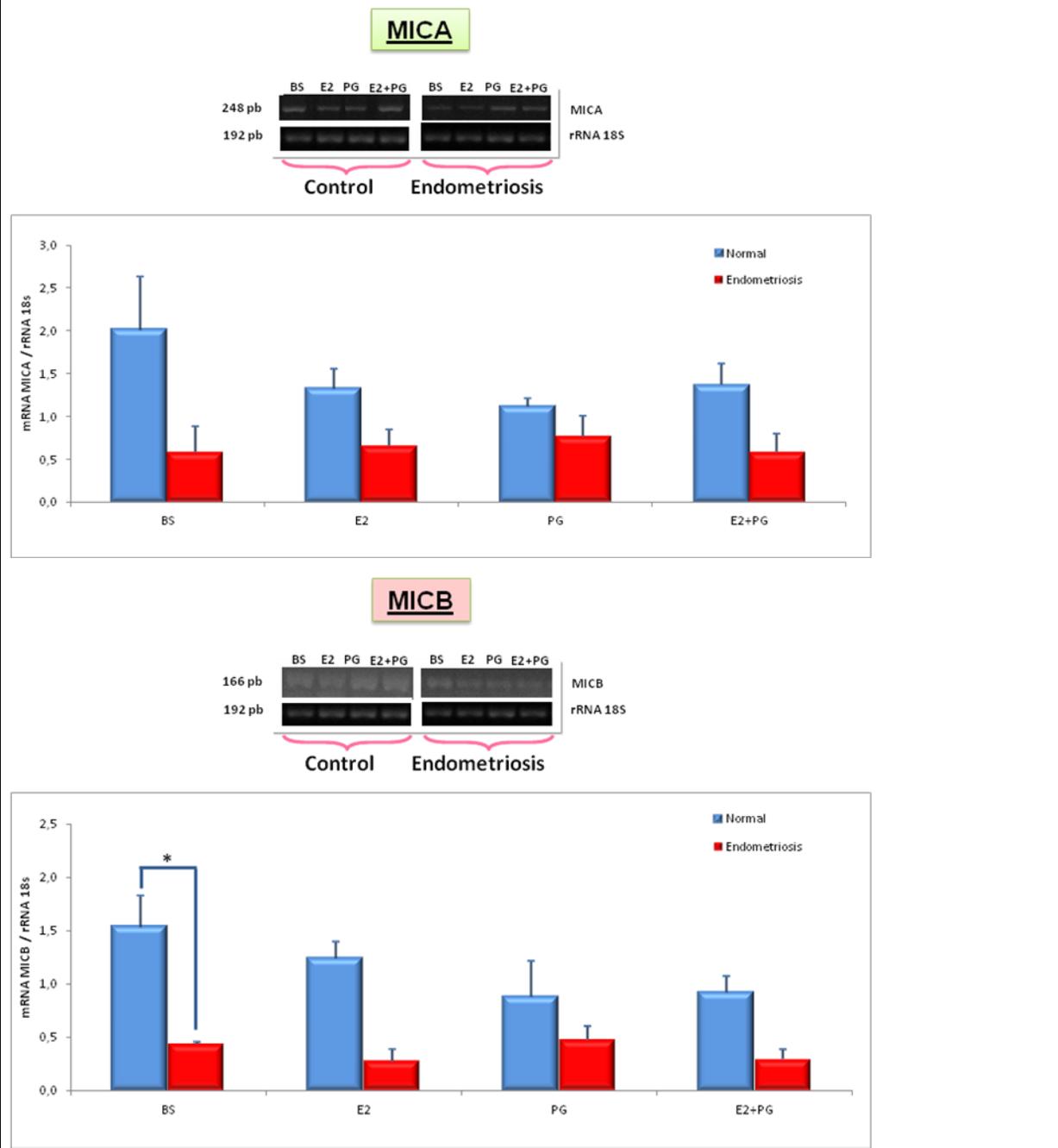


Figura 15. **E₂ y PGE₂ no modifican los niveles de mRNA de MICA y MICB.** Células epiteliales de endometrios de mujeres con y sin endometriosis fueron incubadas con E₂ (10⁻⁸ mol/L) y PGE₂ (10⁻⁸ mol/L) por 24h como se indica en Materiales y Métodos. Se observó presencia de ambos ligandos en las células estimuladas, no encontrándose diferencia significativa en las células con los diferentes estímulos. Se muestra gel representativo. Los resultados son el promedio ± EE de n=3 controles y n=3 pacientes. *p<0,05.

5.5.3 Detección proteica de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 por citometría de flujo

En células endometriales aisladas confirmó la presencia proteica de los ligandos ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3, tanto en el compartimiento de células epiteliales (EEC) como en el de células estromales (ESC) en ambos grupos de estudio, control y endometriosis (Figuras 16 y 17).

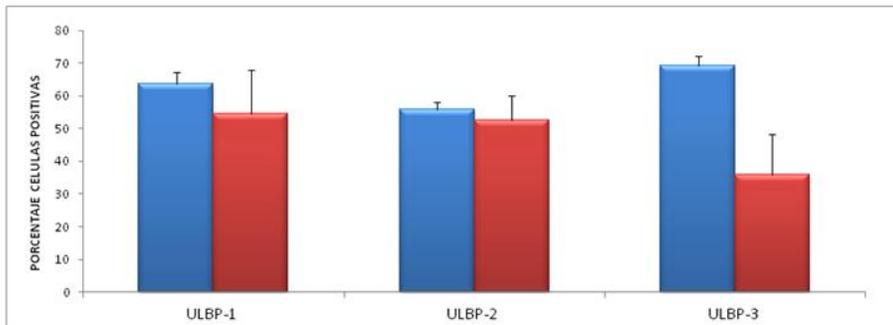
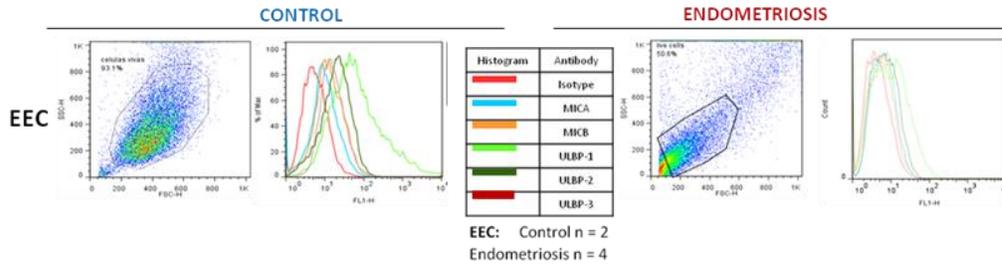
El porcentaje de células positivas para ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 fue similar entre las células epiteliales y estromales aisladas de mujeres controles y pacientes (Figura 16).

Sin embargo, al evaluar la MFI de ULBP-2 y ULBP-3, no así ULBP-1, fue 4,2 y 3,8 veces mayor en las células epiteliales control al compararlo con las de endometriosis ($p < 0,005$; $p < 0,05$; respectivamente) (Figura 17A).

No hubo diferencias en ESC para ninguno de los ligandos estudiados (Figura 17B).

PORCENTAJE CELULAS POSITIVAS: ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3

A) CELULAS EPITELIALES



B) CELULAS ESTROMALES

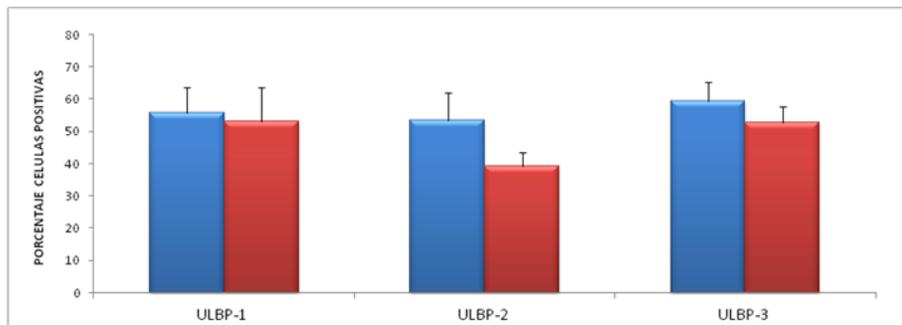
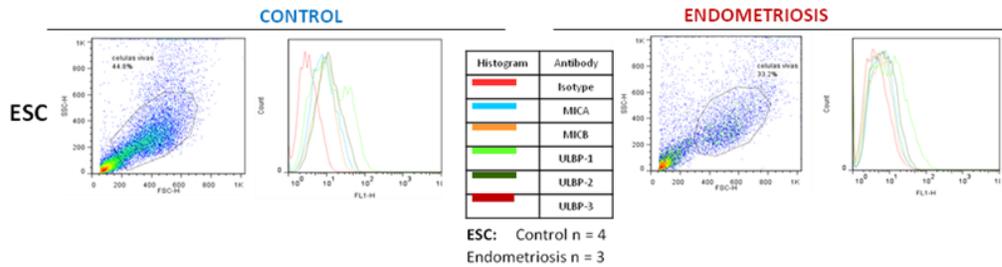
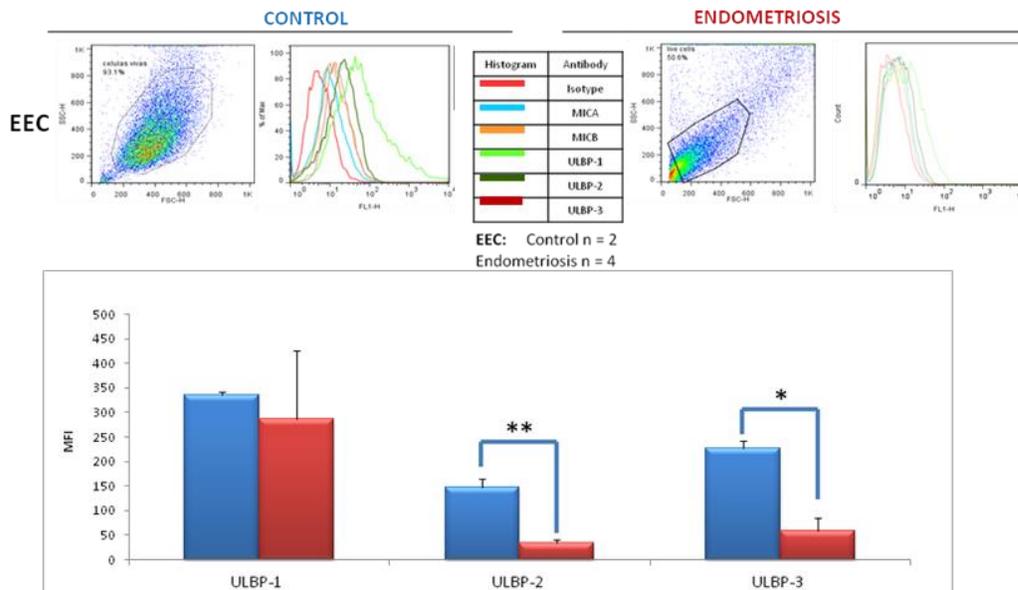


Figura 16. **Porcentaje de células positivas para ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en células endometriales.** Células Epiteliales (EEC) (A) y Células Estromales (ESC) (B) provenientes de endometrios de mujeres con (pacientes) y sin (controles) endometriosis fueron incubadas con los anticuerpos indicados y evaluadas por citometría de flujo. Se muestran los histogramas representativos y el promedio \pm EE de los resultados de los porcentajes de células positivas correspondientes a n=2-4 controles y n=4-3 pacientes.

INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA (MFI): ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3

A) CELULAS EPITELIALES



B) CELULAS ESTROMALES

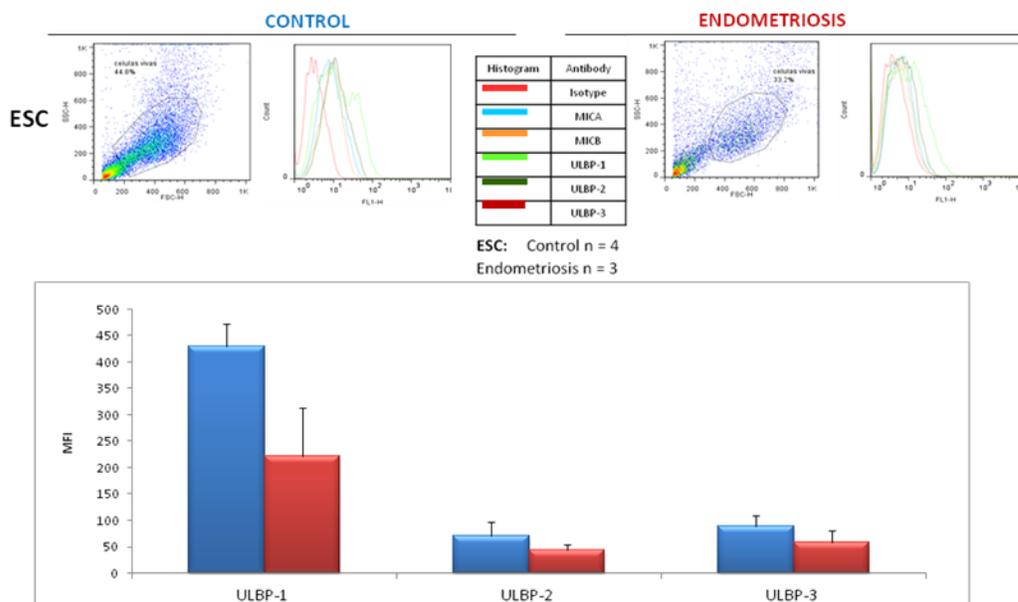


Figura 17. Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) para ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en células endometriales. Células epiteliales (EEC) (A) y Células estromales (ESC) (B) provenientes de endometrios de mujeres con (pacientes) y sin (controles) endometriosis fueron incubadas con los anticuerpos indicados y evaluadas por citometría de flujo. En células epiteliales controles se muestran los histogramas representativos y el promedio \pm EE de los resultados de los porcentajes de células positivas correspondientes a n=2-4 controles y n=4-3 pacientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

5.5.4. Niveles de mRNA de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3

Debido que solamente las células epiteliales (EEC) mostraron diferencia significativa entre los grupos control y pacientes por citometría de flujo, se estudio este tipo celular los niveles de mRNA de los ligando del receptor NKG2D por RT-PCR.

En las células epiteliales de ambos grupos se detectó la expresión de los mRNAs de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3.

Los niveles de mRNA de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 de las células en condición basal fueron mayores en el grupo control al compararlo con el grupo de pacientes, siendo esta diferencia significativa en el caso de ULBP-2 (50%) y UBP-3 (300%) ($p < 0,05$) (Figura 18).

En el caso de las células con los distintos tratamientos, no se observaron diferencias entre ambos grupos, pero los niveles de mRNA mostraron una tendencia a ser mayores en el grupo control.

Al simular un microambiente estrogénico y/o pro-inflamatorio al incubar las células en presencia de E_2 y PGE2, la diferencia observada en la condición basal entre ambos grupos se redujo en todos los ligandos, aunque no fue significativamente diferente respecto al basal correspondiente (Figura 19).

NIVELES de mRNA ULBP EN CELULAS EPITELIALES

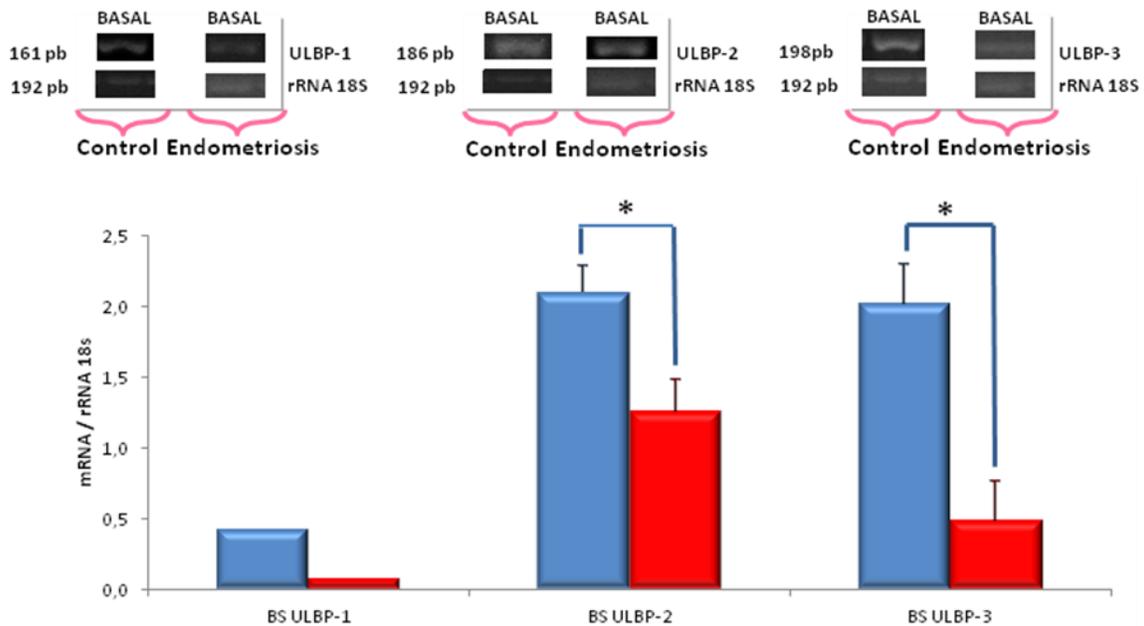


Figura 18. **Los niveles de mRNA de ULBP-2 y ULBP-3 son mayores en endometrio de mujeres control.** Niveles de mRNA de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en células epiteliales aisladas por RT-PCR. Células epiteliales de endometrios de mujeres con y sin endometriosis en condición basal. Se observó presencia de los tres ligandos en células aisladas, observándose mayor nivel en células controles, siendo esto significativo en el caso de ULBP-2 y ULBP-3 al compararlo con el grupo de endometriosis. Se muestra gel representativo. Los resultados son el promedio \pm EE de $n=3$ controles y $n=3$ pacientes. * $p<0,05$.

NIVELES de mRNA ULBP EN CELULAS EPITELIALES

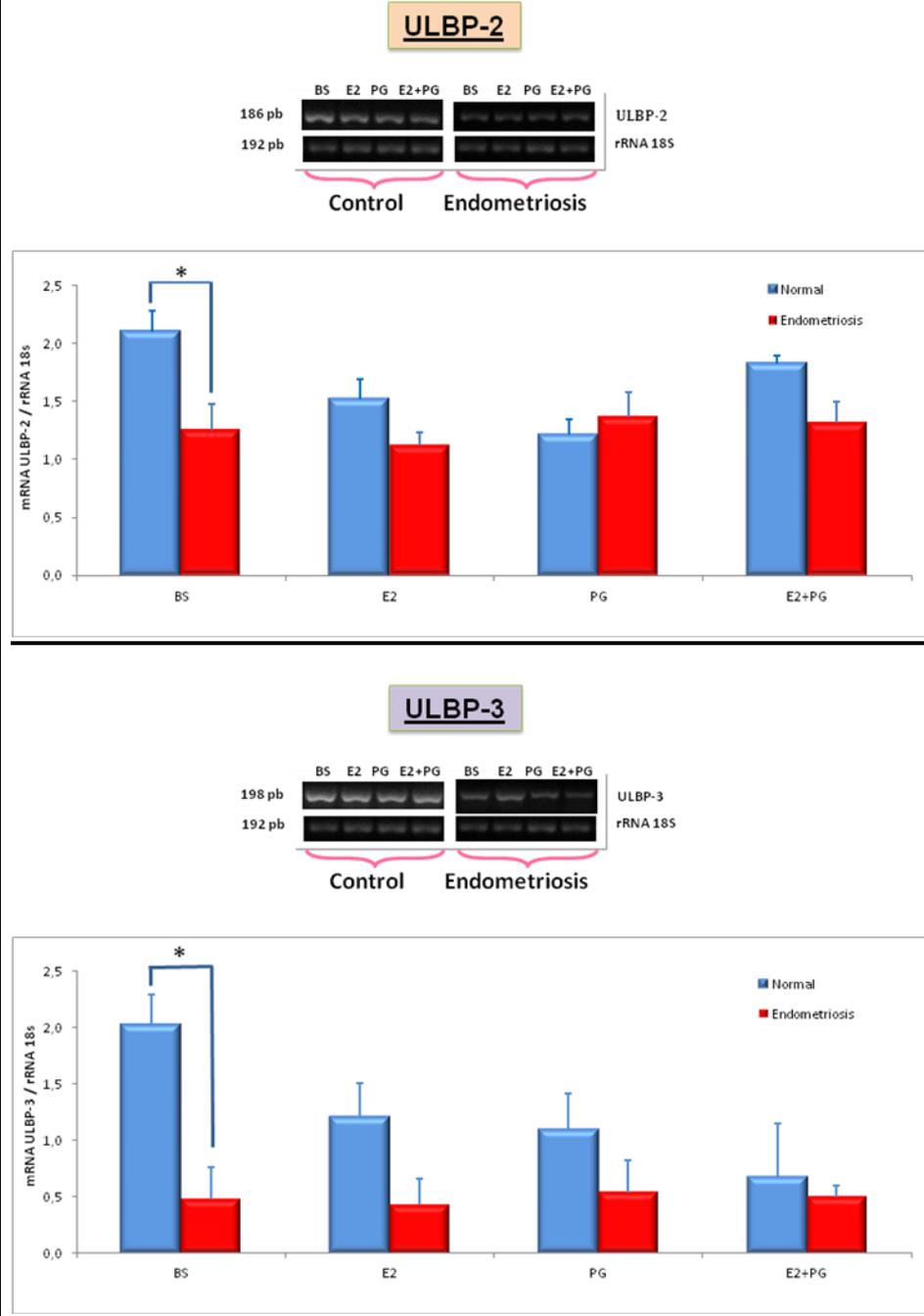


FIGURA 19. E_2 y PGE₂ no modifican los niveles de mRNA de ULBP-2 y ULBP-3. Efecto de E_2 y PGE₂ sobre los niveles de mRNA de ULBP-2 y ULBP-3 en células epiteliales. Células epiteliales de endometrios de mujeres con y sin endometriosis fueron incubadas por 24 h con E_2 (10^{-8} mol/L) y PGE₂ (10^{-8} mol/L) como se indica en Materiales y Métodos. Se muestran gels representativos. Los resultados son el promedio \pm EE de $n=3$ controles y $n=3$ pacientes. * $p<0,05$.

6. DISCUSION

Como se dijo previamente, la endometriosis es una enfermedad invasiva, con diagnóstico también invasivo y cuya patogénesis aún no está claramente entendida. Dentro de las alteraciones que presentan las pacientes, la infertilidad está fuertemente asociada.

Por otra parte, la expresión anómala de numerosos genes en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis ha sido ampliamente reportada, permitiendo que este tejido sea un modelo interesante de estudiar. La caracterización parcial de este tejido ha contribuido a aumentar el conocimiento de esta enfermedad al contrastarlo con endometrio de mujeres sin la patología, lo que ha permitiría buscar blancos moleculares para un adecuado diagnóstico y posibles tratamientos.

El endometrio, durante el ciclo menstrual, es un sitio crítico de sucesos reproductivos tales como la implantación y la menstruación, siendo ambos eventos de carácter inflamatorio por lo que la inmunidad es un blanco importante de estudio. La heterogeneidad de los tipos de células presentes en el endometrio humano incluye a diversas células inmunes que estarían involucradas en funciones reproductivas y/o reacciones inmunológicas (Giuliani et al., 2014). Además, estos elementos celulares inmunes cumplen un papel importante en la producción de moléculas que participan en la regulación de múltiples procesos y han sido involucradas en la etiología de la endometriosis al presentar fallas en algunos elementos de la respuesta inmune, causando el escape de la inmunovigilancia del tejido endometrial ectópico (Seli y Arici, 2003; Baston, 2014). Respecto a los ligandos de NKG2D estudiados en esta Tesis, existe información y resultados respecto a expresión y respuesta en patologías como la leucemia y otros

tipos de tumores, en el que se reveló que la alteración en la interacción entre ligando-receptor, reducía marcadamente la actividad de células NK, afectando la lisis celular (Hilpert et al., 2012), no habiendo información respecto a endometrio normal y de endometriosis.

Como resultados de esta tesis, por primera vez se caracterizan los ligandos de NKG2D, MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3, en el endometrio normal y patológico durante el ciclo menstrual. Los datos muestran que estos ligandos y las citoquinas IL-10 e IL-12 se expresan normalmente en este tejido y que esta expresión varía en forma cíclica indicando una regulación mediada por las hormonas esteroidales ováricas. Sin embargo, la incubación de células epiteliales aisladas con E₂ no modificó significativamente los niveles de mRNA de ninguna de las moléculas analizadas; el reducido número de muestras analizadas y el análisis solamente de células endometriales epiteliales y no de las estromales podría estar explicando estos resultados negativos. La diferente expresión de MICB entre los grupos estudiados con una marcada disminución en la fase secretora tardía en el caso de la endometriosis, podría favorecer el escape a la regulación inmune. La reducción de los niveles de ligandos de activación se relaciona con una menor activación de células NK provocando escape inmune (Sundqvist et al., 2012). Será entonces importante evaluar lo que está ocurriendo a nivel proteico en el endometrio eutópico de ambos grupos.

El estudio del sistema inmune durante la ventana de implantación y el embarazo resulta de mucho interés, pues el embrión debe escapar de los mecanismos inmunes para sobrevivir. De acuerdo a ello, se ha visto que el número de los receptores NKG2D disminuye en sangre periférica, además que aumentan las formas solubles de los ligandos MIC, el cual es un mecanismo para evadir la inmunovigilancia de los

NK (Mincheva-Nilsson et al., 2006; Hilpert et al., 2012). Es por ello que es muy interesante el hallazgo de la mayor expresión de los mRNA de ULBP-3 y de IL-12, ambos activadores de las células NK, en los endometrios eutópicos de fase secretora media de mujeres con endometriosis, lo que podría traducirse en diferencias proteicas que afectarían la ventana de implantación o el reconocimiento como extraño al embrión temprano impidiendo su adecuada implantación y provocando su eliminación. Los diferentes patrones observados entre los niveles de mRNA y la proteína de IL-12 sugieren una posible secreción de esta citoquina por parte de las células endometriales, por ello, la medición de la concentración de IL-12 en homogeneizado endometrial sería necesaria para confirmar esta propuesta.

La endometriosis se ha vinculado con menores tasas de embarazo en mujeres que fueron sometidas a procedimientos de fertilización de baja y alta complejidad (Huneus et al., 2000). Sin embargo, los mecanismos específicos que causan estas bajas tasas de embarazo aún son poco comprendidos, y hasta la fecha, el tratamiento más común para tratar la infertilidad es la remoción quirúrgica del tejido endometriótico (Lu et al., 2013). Además, fallas en la implantación embrionaria, aborto recurrente y endometriosis han sido correlacionados con fallas en la regulación de citoquinas (Tamura et al., 2011, 2014). Los resultados de IL-10 obtenidos en esta Tesis muestran elevados y constantes niveles en el compartimento glandular en el endometrio de mujeres control, independiente de la fase del ciclo menstrual. Además, en el estroma endometrial estos niveles se incrementan fuertemente en las fases media y tardía bajo el predominio de la progesterona. Todo esto sugeriría que, durante el proceso de implantación e invasión embrionaria participaría IL-10 disminuyendo las señales inmunes. A diferencia de lo encontrado en las células controles donde la canti-

dad de esta citoquina es marcadamente mayor desde la fase secretora media, en mujeres con endometriosis, los constantes y disminuidos niveles de IL-10 en ambos compartimientos celulares, podrían explicar la infertilidad descrita en esta patología (D'Hooghe et al., 2003; Kao et al., 2003). Ha sido reportado que IL-10 modula la resistencia a estímulos inflamatorios regulando negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias, protegiendo el sitio de implantación de la respuesta inmune materna, mostrando un aumento en sus niveles en los embarazos exitosos (Sarah et al., 2007; Vigano et al.; 2002).

Por otra parte, la marcada diferencia de IL-10 en la fase secretora tardía entre los endometrios de mujeres con y sin endometriosis implicaría que la respuesta inmune es distinta en ambos tipos de endometrio dada su característica inmunosupresora. Así el tejido endometrial en endometriosis, en una etapa no concepcional, al ser eliminado y llegar a la cavidad pélvica por menstruación retrógrada, al activarse la respuesta inmune tendría menor contenido de IL-10 y por ende, menor respuesta inmunosupresora. Esto induciría la actividad de los macrófagos, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y metaloproteinasas que favorecen la implantación y mantención ectópica como también la inflamación crónica descrita en esta enfermedad. En relación a ello, la aplicación de IL-10 a ratones a los que se les ha inducido endometriosis, reduce el tamaño y el peso de las lesiones al compararlo con el grupo sin tratamiento (Neri et al., 2011) indicando un posible rol que IL-10 tendría en la etiopatogenia de la endometriosis.

La detección de los ligandos de NKG2D en células epiteliales y estromales aisladas de endometrios de mujeres con y sin endometriosis confirma que la expresión proteica corresponde a estos tipos celulares y no a leucocitos infiltrados endometriales.

Además, resulta muy interesante que las células epiteliales de cultivo, que son extraídas mediante raspado de placa, lo cual podría traducirse en stress celular, muestre en el caso de células provenientes de endometrios controles mayor intensidad en la expresión proteica para los ligandos de activación MICA, ULBP-2 y ULBP-3 al compararla con las células epiteliales de endometriosis, reflejando una menor respuesta de estas últimas ante una situación de stress. Esto concuerda con reportes que indican que estos ligandos pueden ser expresados por células estresadas y de esta forma activar al receptor de activación NKG2D de células NK humanas (Bauer et al., 2006). Este comportamiento que se observa en las células controles, ocurriría deficientemente en las células provenientes de endometrios de endometriosis, lo cual podría explicar la viabilidad y capacidad invasora de los debris menstruales en la cavidad pélvica de estas pacientes.

Las diferencias encontradas hasta ahora pueden indicar que: 1) la preparación del endometrio en la etapa de ventana implantacional estaría alterada en el endometrio de endometriosis, considerando que el sistema inmune juega un rol muy importante para el éxito de la implantación embrionaria y en la mantención del embarazo; 2) en endometriosis, la disminución de IL-10 en el endometrio de fase secretora tardía, que será eliminado como debris menstrual, podría favorecer la formación de lesiones endometriales ectópicas, y 3) en este mismo contexto, los menores niveles de los ligandos en células endometriales aisladas de las pacientes permitiría el escape a la inmunovigilancia. En conjunto, estos resultados confirman la hipótesis de una respuesta inmunológica alterada en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis y la posible implicancia en su etiopatogenia de los factores inmunológicos estudiados.

7. CONCLUSION

Estos resultados sugieren que los ligando del receptor de activación NKG2D, principalmente MICA y ULBP-2 como también las IL-10 e IL-12 jugarían un papel importante en las etapas finales del ciclo menstrual, período en que el endometrio experimenta una exhaustiva remodelación preparándose para la acogida embrionaria o en su defecto, para su eliminación a través de la menstruación. Las diferencias observadas en el endometrio de mujeres con endometriosis podrían explicar, en parte, la infertilidad como también la capacidad del tejido menstrual de escapar a la inmunovigilancia como ha sido descrito en estas pacientes.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Al-jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe G, Markham R, Fraser I. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibers in an endometrial biopsy: a double blind study. *Hum Reprod*, 2009; 24: 3019-3024.
2. Alheim K, Andersson C, Tingsborg S, Ziolkowska M, Schultzberg M, Bartfai T. Interleukin 1 expression is inducible by nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 1991; 88: 9302-9306.
3. Arck PC, Merali FS, Stanisz AM, Stead RH, Chaouat G, Manuel J, Clark DA. Stress-induced murine abortion associated with substance P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua. *Biol Reprod*, 1995; 53: 814-819.
4. Arck PC. Stress and pregnancy loss: role of immune mediators, hormones and neurotransmitters. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 46: 117-123.
5. Arici A, Oral E, Attar E, Tazuke SI, Olive DL. Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril*. 1997; 67: 1065-1072
6. Attia G, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr B, Bulun S. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 2897-2902.
7. Bacon I, Eagle RA, Meyer M, Easom M, Young NT, Trowsdale J. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol*, 2004; 173: 1078-1084.
8. Baird DT, Cameron ST, Critchley HOD, Drudy TA, Howen A, Jones RL, et al. Prostaglandins and menstruation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996; 70: 15-17.
9. Baston JI, Baranao RI, Ricci AG, Bilotas MA, Olivares CN, Singla JJ, Gonzalez AM, Stupirski JC, Croci DO, Rabinovich GA, Meresman, G. F. Targeting galectin-1-induced angiogenesis mitigates the severity of endometriosis. *J Pathol*. 2014; 234: 329-337
10. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier II. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999; 285: 727-729.
11. Bayas A, Kruse N, Moriabadi NF, Weber F, Hummel V, Wohleben G, Gold R, Toyka KV, Rieckmann P: Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. *Neurosci Lett*, 2003; 335:155-158.
12. Bokor A, Kyama C, Vercruyse L, Fassbender A, Gevaert O, Vodolazkaia A, Moor BD, Fulop V, D'Hooghe T. Density of small diameter sensory nerve fibres in endometrium: a semi-invasive diagnostic test for minimal to mild endometriosis. *Hum Reprod*, 2009; 24: 3025-3032.
13. Bottino C, Castriconi R, Moretta L, Moretta A. *Trends Immunol*, 2005; 26: 221-226.
14. Bruner-Tran K, Eisenberg E, Yeaman G, Anderson T, Mc Bean J, Osteen K. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87: 4782-4791.
15. Bulun SE, Utsunomiya H, Lin Z, Yin P, Cheng YH, Pavone ME, et al. Steroidogenic factor-1 and endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 300: 104-108.

16. Burbach GJ, Kim KH, Zivony AS, Kim A, Aranda J, Wright S, Naik SM, Caughman SW, Ansel JC, Armstrong CA: The neurosensory tachykinins substance P and neurokinin A directly induce keratinocyte nerve growth factor. *J Invest Dermatol*, 2001; 117: 1075–1082.
17. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res* 2008; 40: 18-34
18. Bustelo XR. Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene*, 2001; 20: 6372–6381.
19. Castro J, Araya G, Inostroza P, Hidalgo P, González-Ramos R, Sovino H, Boric MA, Fuentes A, Johnson MC. Differential expression of Upstream Stimulatory Factor (USF) 2 variants expression in eutopic endometria from women with endometriosis; estradiol regulation. *Biol Research*. 2015; 48: 56
20. Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305: 129-135.
21. Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA. Cytokine-dependent abortion in CBA · DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *J Immunol*, 1998; 160: 545–549.
22. Collette T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M, Akoum A. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of MMP-9. *Hum Reprod*, 2004; 18: 1257-1264.
23. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CI, Chin W, Armitage R, Fanslow W. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 2001; 14: 123-133.
24. Cochery-Nouvellon E, Nguyen P, Attaoua R, Cornillet-Lefebure P, Mercier E, Vitry F, Gris JC. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms in women with pregnancy loss: preferential association with embryonicwastage 1. *Biology of Reproduction*, 2009; 80: 1115-1120.
25. Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E, Cebecauer M, Colonna M, Vivier E, Held W. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood*, 2005; 106: 1711–1717.
26. Crane C, Austgen K, Haberthur K, Hofmann C, White K, Avanesyan L, Fong L, Campbell M, Cooper S, Oakes S, Parsa A, Lanier L. Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients. *Immunology and Inflammation*, 2014; 111: 12823-12828.
27. Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev*. 2006; 214: 161-185.
28. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuseri N, Ryffel B, Dalod M, et al. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol*. 2008;181(3):1627-1631.
29. Chaouat G, Menu E, De Smedt D, Khrihnan L, Hui L, Meliani AA, Martal J, Raghupathy R, Wegmann TG. The emerging role of IL-10 in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* , 1996; 35: 325–329.
30. Chillik CF, Acosta AA, Garcia JE, Perera S, Van Uem JF, Rosenwaks Z, et al. The role of in vitro fertilization in infertile patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 1985; 44: 56-61.
31. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*. 1993; 178: 1041-1048.

32. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, Meuleman C. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med*, 2003; 21: 243-254.
33. Dmowski WP, Gebel HM, Braun DP. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl*. 1994; 159: 7-14
34. Farquhar CM. Extracts from the "clinical evidence". *Endometriosis*. *BMJ*, 2000; 320: 1449-1452.
35. Fassbender A, Verbeeck N, Bornigen D, Kyama CM, Bokor A, Vodolazkaia A, Peeraer K, Tomassetti C, Meuleman C, Gevaert O, Van de Plas R, Ojeda F, De Moor B, Moreau Y, Waelkens E, D'Hooghe TM. Combined mRNA microarray and proteomic analysis of eutopic endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod*, 2012; 27: 2020-2029.
36. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1983; 23: 239-257.
37. Gracia-Velasco J, Arici A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? *Hum Reprod*, 1999; 14: 77-89.
38. García-Velasco J, Mulayim N, Kayisli U, Arici A. Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 2002; 78: 855-859.
39. Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig KW. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2005; 102: 7641-7646.
40. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Fabris N, Cignitti M, Romanini C. Natural killer cell activity in endometriosis: correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obstet Gynecol*, 1993; 81: 665-668.
41. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol*, 1992; 143: 127-142.
42. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol*, 2002; 3: 1150-1155.
43. Girart M, Fuertes M, Domaica C, Rossi L, Zwirner N. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN- γ secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J Immunol*, 2007; 179: 3472-3479.
44. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Amer J Reprod Immunol*. 2014; 72: 262-269.
45. Guarnaccia M, Olive DL. The structure and future of endometriosis research. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1997; 24: 445-465.
46. Guia S, Cognet C, de Beaucoudrey L, Tessmer MS, Jouanguy E, Berger C, et al. A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells *in vivo*. *Blood*. 2008;111: 5008-5016.
47. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. 2006; 12: 1065-1074.
48. Hanna J, Mandelboim O. When killers become helpers. *Trends Immunol*. 2007; 28: 201-206.
49. Hassa H, Tanir HM, Tekin B, Kirilmaz SD, Sanin Mutlu F. Cytokine and immune cells levels in peritoneal fluid and peripheral blood of women with early- and late-staged endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*, 2009; 279: 891-895.

50. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grunebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Rainer H. “Comprehensive Analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses”. *J Immunol*, 2012; 189: 1360-1371.
51. Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Lee TY. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod*, 1995; 10: 2671-2675.
52. Ho HN, Wu MY, Chao KH, Chen CD, Chen SU, Yang YS. Peritoneal interleukin-10 increases with decrease in activated CD4+ T lymphocytes in women with endometriosis. *Hum Reprod*, 1997; 12: 2528-2533.
53. Huneeus A, Alba JF, Devoto L, Soto E, Vantman D, Gunther A, Fuentes A, Martínez C. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 2000; 65:255-261.
54. Hudelist G, Keckstein J, Czerwenka K, Lass H, Walter I, Auer M, Wieser F, Wenzl R, Kubista E, Singer CF. Estrogen receptor α and matrix metalloproteinase 1 are coexpressed in uterine endometrium and endometriotic lesions of patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 2005; 84: 1249-1256.
55. Lu H, Yang X, Zhang Y, Lu R, Wang X. Epigenetic disorder may cause downregulation of HOXA10 in the eutopic endometrium of fertile women with endometriosis. *Reprod Sci*, 2013; 20: 78-84.
56. Iwasaki K, Makino T, Maruyama T, Matsubayashi H, Nozawa S, Yokokura T. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 1993; 38: 229-234.
57. Johnson MC, Pinto C, Alves A, Palomino A, Fuentes A, Boric MA, Vega M. P₄₅₀Arom and estrogenic microenvironment of eutopic endometria in endometriosis. *Rev Med Chile*, 2004; 132: 1475-1482.
58. Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF- β 1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005; 8: 45-50.
59. Kao L, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang J, Taylor R, Osteen K, Lessey B, Giudice L. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinol*, 2003; 144: 2870-2881.
60. Kennedy MK, Picha KS, Shanebeck KD. Interleukin-12 regulates the proliferation of Th1, but not Th2 or Th0, clones. *Eur J Immunol*, 1994; 24: 2271-2278.
61. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 15563-15568.
62. Kyama C, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mwenda J, Mathieu C, D'Hooghe T. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines and adhesion factor in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 2008; 89: 301-310.
63. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2004; 202: 96-105.
64. Lebovic D, Mueller M, Taylor R. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 2001; 75: 1-10.
65. Li P, Morris DI, Wilcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*, 2001; 2: 443-451.
66. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol*, 1993; 151:4562-4573.

67. Liu X, He Y and Peng D. Expression of metalloproteinase-9 in ectopic endometrium in women with endometriosis. *Di Yi Jun Yi Dae Xue Xue Bao*, 2002; 22: 467-469.
68. López-Larrea C, Suárez-Álvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, González S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008;14:179-189
69. Lu H, Yang X, Zhang Y, Lu R, Wang X. Epigenetic disorder may cause downregulation of HOXA10 in the eutopic endometrium of fertile women with endometriosis. *Reprod Sci*, 2013; 20: 78-84.
70. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Farhat R, Hassan N, Bander A. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod*, 2000; 15: 2011–2017.
71. Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, Sela HY, Stern-Ginossar N, Lankry D, et al. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol*. 2008a; 181: 1869-1876.
72. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta*. 2008b;29 Suppl A:S60-6.
73. Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 9120-9125.
74. Matson PL, Yovich JL. The treatment of infertility associated with endometriosis by in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986; 46: 432-434.
75. 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: 911-916
76. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*, 1996; 11: 220-223.
77. Melega C. Tissue factors influencing growth and maintenance of endometriosis. *Ann Acad Sci*, 1991; 622: 256-265.
78. Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, Hernestal J, Baranov V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol*, 2006; 176: 3585-3592.
79. Moffett-King A. *Nat. Rev. Immunol*, 2002; 2: 656-663.
80. Neri D, Schwager K, Bootz F, Imesch P, Kaspar M, Trachsel E. The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-10 inhibits endometriosis in a syngeneic mouse model. *Hum Reprod*, 2011; 9: 2344-2352.
81. Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 174-179.
82. Olive DL, Shwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med*, 1993; 328: 1756-1769.

- 83.** Olivennes F, Feldberg D, Liu HC, Cohen J, Moy F, Rosenwaks Z. Endometriosis: a stage by stage analysis the role of in vitro fertilization. *Fert Steril.* 1995; 64: 392-398.
- 84.** Oosterlynck DJ, Comillie FJ, Waer M et al. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*, 1991; 56:45-51.
- 85.** Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M et al. The natural killer cell activity of peritoneal fluid is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 1992; 58:290-295.
- 86.** Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, Girardi M, Hayday AC. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol*, 2005; 6: 928-937.
- 87.** Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JT, Gorstein F, Matrisian LM. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc Natl Acad Sci*, 1994; 91: 10129-10133.
- 88.** Parham, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol*, 2005; 5: 201-214.
- 89.** Pino M, Galleguillos C, Torres M, Sovino H, Fuentes A, Boric MA, Johnson, MC. Association between MMP1 and MMP9 activities and ICAM1 cleavage induced by tumor necrosis factor in stromal cell cultures from eutopic endometria of women with endometriosis. *Reproduction*. 2009; 138: 837-847.
- 90.** Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*, 1997a; 18: 478-482.
- 91.** Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol*, 1997b; 37: 478-484.
- 92.** Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3: 781-790.
- 93.** Raulet DH, Guerra N. *Nat. Rev. Immunol*, 2009; 9: 568-580.
- 94.** Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004;114(6):744-54.
- 95.** Riley JK, Yokoyama WM. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol.* 2008; 59: 371-387.
- 96.** Salamonsen LA, Butt AR, Hammond FR, Garcia S, Zhang J. Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82: 1409-1415.
- 97.** Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 1927; 14: 422-469.
- 98.** Sarah A. Robertson A, Care S, Skinner RJ. Interleukin 10 Regulates Inflammatory Cytokine Synthesis to Protect Against Lipopolysaccharide-Induced Abortion and Fetal Growth Restriction in Mice. *Biol Reprod*, 2007; 76: 738-748.
- 99.** Schmitt E, Hoehn P, Huels C, Goedert S, Palm N, Rude E, Germann T. T helper type 1 development of naive CD41 T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol*, 1994; 24: 793-798.
- 100.** Scully JL, Otten U. NGF: not just for neurons. *Cell Biol Int*, 1995; 19: 459-469.

- 101.** Seli E, Arici A. Endometriosis: interaction of immune and endocrine systems. *Semin Reprod Med.* 2003; 21: 135-144.
- 102.** Serrano AE, Menares-Castillo E, Garrido-Tapia M, Hager Ribeiro C, Hernández C, Mendoza-Naranjo A, Gatica-Andrades M, Valenzuela-Díaz R, Zúñiga R, López M, Salazar-Onfray F, Aguillón JC, Molina MC. Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunol Cell Biol.* 2011; 89 :447-457.
- 103.** Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 222: 1-15.
- 104.** Somogliana E, Viganò P, Gaffuri B, Guarneri D, Beca M, Vignali M. Human endometrial stromal cell as a source of soluble intercellular adhesion molecule. *Hum Reprod.* 1996; 11: 1190-1194.
- 105.** Steele RW, Dmowski WP, Marmar DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1984; 6: 33-36.
- 106.** Stern AS, Podslasky FJ, Holmes JD. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 6808-6812.
- 107.** Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Tamura H, Ono M, Nakata M, et al. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum Reprod.* 1996; 11: 1073-1078.
- 108.** Sugino N, Karube-Harada A, Kashida S, Takiguchi S, Kato H. Reactive oxygen species stimulate prostaglandin F2a production in human endometrial stromal cells in vitro. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1797-1801.
- 109.** Sugino N. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta.* 2007; 28 Suppl A: S133-136.
- 110.** Sundqvist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PG. Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis. *Hum Reprod.* 2012; 27:2737-2746.
- 111.** Tamura I, Taketani T, Lee L, Kizuka F, Taniguchi K, Maekawa R, et al. Differential effects of progesterone on COX-2 and Mn-SOD expressions are associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: E1073-1082.
- 112.** Tamura H, Takasaki A, Nakamura Y, Numa F, Sugino N. A pilot study to search possible mechanisms of ultralong gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in IVF-ET patients with endometriosis. *J Ovarian Res.* 2014; 7: 100.
- 113.** Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 59: 505–511.
- 114.** Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv. Immunol.* 1998; 70: 83–243.
- 115.** Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig.* 2006; 13: 467-476.
- 116.** Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. NKG2D-mediated signalling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol.* 2006; 7: 524-532.
- 117.** Venkataraman GM, Suci D, Groh V, Boss JM, Spies T. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol.* 2007; 178: 961-969.

- 118.** Vigano P, Vercellini P, DiBlasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M. Deficient anti-endometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 1991; 56: 894-899.
- 119.** Vigano P, Pardi R, Magri B, Busacca M, DiBlasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on cultured human endometrial stromal cells and its role in the interaction with natural killers. *Am J Reprod Immunol*, 1994; 32: 139-145.
- 120.** Vigano P, Somigliana E, Mangioni S, Vignali M, Vignali M, Di Blasio AM. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87: 5730–5736.
- 121.** Vigano P, Parrazzini F, Somogliana E, Vercellini P. Endometriosis: Epidemiology and aetiological factors. *Best Pract & Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004; 18: 177-200.
- 122.** Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14: 306–311.
- 123.** Vivier E, Raulet D, Moretta A, Caligiuri M, Zitvogel L, Lanier L, Yokoyama W, Sophie Ugolini S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*, 2011; 331: 44-49.
- 124.** Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. *Blood*, 2005; 106: 2252-2258.
- 125.** Wei L, Garcia JA, Martinez OM, Krams SM. Distinct Roles for the NK Cell-Activating Receptors in Mediating Interactions with Dendritic Cells and Tumor Cells *J Immunol*, 2011; 186: 222-229.
- 126.** Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 1999; 285: 730-732
- 127.** Zhang H, Niu Y, Feng J, Guo H, Ye X, Cui H. Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertil Steril*. 2006; 86: 274-282.