

- ce KM, Asare-Anane H, et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(1):R134-9.
68. Han J, Xu J, Epstein PN, Liu YQ. Long-term effect of maternal obesity on pancreatic beta cells of offspring: reduced beta cell adaptation to high glucose and high-fat diet challenges in adult female mouse offspring. *Diabetologia*. 2005;48(9):1810-8.
69. Ford SP, Zhang L, Zhu M, Miller MM, Smith DT, Hess BW, et al. Maternal obesity accelerates fetal pancreatic beta-cell but not alpha-cell development in sheep: prenatal consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(3):R835-43.
70. Zhang L, Long NM, Hein SM, Ma Y, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity in ewes results in reduced fetal pancreatic beta-cell numbers in late gestation and decreased circulating insulin concentration at term. *Domestic Animal Endocrinology*. 2011;40(1):30-9.

Revisiones

Alteraciones inmunológicas en endometriosis

Immunological abnormalities in endometriosis

Dra. Rosa Inés Barañao

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET

Vuelta de Obligado 2490 (C1428ADN) CABA, Argentina - E-mail: inesbaranao@ibyme.conicet.gov.ar

Resumen

La endometriosis es una patología ginecológica estrógeno-dependiente e inflamatoria que se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina.

¿Por qué en las pacientes con endometriosis el tejido endometrial ectópico no es eliminado por el sistema inmunológico?

En el presente trabajo se describe una serie de alteraciones en las distintas poblaciones leucocitarias, citoquinas y otros factores solubles reguladores de la respuesta inmunológica presentes en las pacientes con endometriosis.

Asimismo, se describen los mecanismos por los cuales estas alteraciones, no sólo favorecen la “tolerancia inmunológica” hacia los implantes endometriósicos, sino que, por el contrario, colaboran en el desarrollo de la enfermedad al estimular la proliferación y angiogénesis e inhibir la apoptosis del tejido endometrial ectópico.

Palabras clave: endometriosis, líquido peritoneal, tolerancia, macrófagos, citoquinas.

Abstract

Endometriosis is a gynecological inflammatory estrogen dependent pathology that is defined as the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity.

Why in patients with endometriosis the ectopic endometrial tissue is not eliminated by the immune system?

In this paper a series of abnormalities in different leukocyte populations, cytokines and other regulatory soluble factors of the immune response, present in patients with endometriosis, are described.

Also are described the mechanisms by which these changes, not only favor the “immunological tolerance” to endometriotic implants but on the contrary, collaborating in the development of the disease by stimulating the angiogenesis and proliferation and inhibit the apoptosis of ectopic endometrial tissue.

Key words: endometriosis, peritoneal liquid, tolerance, macrophages, cytokines.

La endometriosis se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Es una enfermedad ginecológica benigna, inflamatoria y estrógeno-dependiente. Sus principales síntomas son el dolor pélvico agudo previo o intramenstrual y/o dolor crónico y la infertilidad(1). El dolor puede ser tan intenso que afecta la calidad de vida de la mujer, desde sus relaciones hasta sus actividades diarias y es además la tercera causa de hospitalización ginecológica(2,3).

Es una enfermedad que afecta a alrededor del 10-15% de las mujeres en edad reproductiva; existen alrededor de 200 millones de pacientes en el mundo y un millón en la Argentina. Sin embargo, es posible que la población afectada sea mucho mayor por ser una patología subdiagnosticada debido a que culturalmente se acepta como “normal” que las menstruaciones puedan ser muy dolorosas y porque la única manera de obtener un diagnóstico certero es mediante una laparoscopia(4). Las pacientes con endometriosis se presentan a la consulta generalmente por problemas de infertilidad (dado que entre el 50-80% de estas pacientes son infértiles) y se ha estimado que el retraso en el diagnóstico es de alrededor de 7 años(5).

Hasta el momento, la teoría más aceptada para explicar su etiología es la de la implantación propuesta por Sampson, que sugiere el paso de fluido menstrual retrógrado a través de las trompas de Falopio y su posterior implantación en la cavidad peritoneal, adjudicándole un origen eutópico a las lesiones endometrióticas(6). En ciertos aspectos, este mecanismo se asemeja al mecanismo de metástasis de células neoplásicas y es la razón por la que en el pasado a la endometriosis se la consideró como un “cáncer benigno”.

No obstante, la menstruación retrógrada es frecuente en la mayoría de las mujeres en edad reproductiva (76-90%), y han sido identificados fragmentos endometriales en mujeres con endometriosis y sin ella(7). Esto sugiere que existen otros factores que hacen posible la adherencia y el desarrollo de estos implantes sólo en un porcentaje restringido de mujeres que evidencian clínicamente esta patología.

Un mecanismo posible es que el tejido endometrial de las mujeres que desarrollan endometriosis posea características diferentes a las del tejido de las mujeres normales. Basándose en esta hipótesis, distintos autores han demostrado que el tejido endometrial de estas pacientes presenta una capacidad de proliferación y supervivencia incrementadas, lo que favorecería su persistencia y crecimiento en sitios ectópicos(8-10).

Sin embargo, hasta el momento existen interrogantes sin responder acerca de esta enigmática enfermedad: *¿Por qué el tejido endometrial ectópico no es eliminado de la cavidad peritoneal por el sistema inmunológico? ¿Qué alteraciones del sistema inmunológico presentan las pacientes con endometriosis?*

En un intento de responder estas preguntas, este trabajo se concentrará en las alteraciones inmunológicas en el ambiente peritoneal de las pacientes con endometriosis y su posible implicancia en el desarrollo de la enfermedad.

Alteraciones en las poblaciones leucocitarias

Células presentadoras de antígenos

Cuando un antígeno logra atravesar las barreras naturales del organismo y supera la respuesta inmunológica inespecífica, es captado por distintas células fagocíticas. Estas lo fragmentarán en pequeños péptidos que se ensamblarán a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y así, mediante el proceso de “presentación antigénica”, serán reconocidos por los linfocitos T de los ganglios linfáticos más cercanos dando inicio a una respuesta inmunológica específica.

Las principales células presentadoras de antígenos (CPA) son las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B2.

Si el antígeno es extracelular, se ensamblará a

un antígeno de histocompatibilidad (HLA) de clase II y será presentado a los linfocitos T “helper” (Th) o colaboradores (cuya molécula característica de membrana es la CD4). Los linfocitos Th generarán una serie de citoquinas e inducirán una respuesta “inflamatoria” (Th1) o antiinflamatoria/tolerogénica” (Th2/Th3) de acuerdo con el tipo de antígeno presentado. Si se trata de un antígeno intracelular, los péptidos resultantes se ensamblarán en antígenos HLA de clase I y serán presentados a los linfocitos T citotóxicos (Tc) (cuyo marcador de membrana es la molécula CD8). Los linfocitos Tc generarán un tipo de respuesta inmune citotóxica.

Células dendríticas: con respecto a las células dendríticas (CD) en endometriosis, hasta el momento existe muy escasa bibliografía. En un artículo publicado por Tariverdian y cols.(11) sobre las distintas poblaciones de células inmunocompetentes en el líquido peritoneal de mujeres infértiles con endometriosis y sin ella, se muestra que en las mujeres con endometriosis existe una disminución de CD inmaduras (sobre todo en estadios avanzados). Estas CD inmaduras están implicadas principalmente en la vigilancia inmunológica y en la captura del antígeno de tejidos periféricos, por lo tanto, en estas pacientes esta función estaría disminuida.

Por otra parte, el grupo del Dr. Ian Fraser(12) ha demostrado que en el tejido endometrial ectópico existe un aumento de estas CD inmaduras. En este tejido, la principal función de estas células sería la de estimular la angiogénesis, como también se ha demostrado en un modelo murino de endometriosis(13).

Constan evidencias experimentales que avalan varios orígenes posibles para las CD. Existe un progenitor común con las células mieloides (CD34+CD13+) que bajo el estímulo de determinadas citoquinas puede generar dos tipos de poblaciones precursoras de CD: una dará origen a las células de Langerhans y la otra podrá diferenciarse a macrófagos o a CD carentes de gránulos. Por otra parte, el monocito sanguíneo bajo el estímulo del factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas (GM-CSF) e interleuquina 4 (IL-4) puede dar origen a CD inmaduras. Finalmente, en presencia de los signos apropiados, los macrófagos pueden convertirse en CD(14).

En este sentido, se ha demostrado que el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis estimula la diferenciación de monocitos hacia macrófagos y no hacia CD(15).

Macrófagos: en nuestras evaluaciones hemos observado que tanto las pacientes con endometriosis leve como aquellas con estadios avanzados de la enfermedad presentaban un significativo aumento de macrófagos peritoneales con respecto a las mujeres controles; alrededor del 90% de las células presentes en el líquido peritoneal eran macrófagos, sin embargo, esto era más evidente al

inicio de la enfermedad(16,17). Al mismo tiempo, encontramos que, de manera semejante, los macrófagos fagocíticos y metabólicamente activos estaban más aumentados en las pacientes con endometriosis leve, aunque permanecían significativamente elevados en estadios severos(16).

Inversamente, al evaluar los porcentajes de macrófagos peritoneales que expresaban antígenos HLA de clase II en su superficie (en particular HLA-DR), o sea, aquellos capaces de realizar una presentación antigénica, observamos que estaban significativamente disminuidos en las pacientes con endometriosis, independientemente del grado de la enfermedad(16).

Posteriormente otros autores(18,19) hallaron que existía una disminución de la expresión del HLA-DR en los macrófagos peritoneales de las pacientes con endometriosis y esto era coincidente con la disminución en los niveles de interferón gamma (IFN γ) en el líquido peritoneal(18).

Kyu-Sup Lee y cols.(20) demostraron que el agregado de líquido peritoneal de pacientes con endometriosis disminuye la expresión de HLA-DR y otras moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. Dichos autores trabajaron con cultivos de una línea celular monocítico/macrofágica (THP-1) y cultivos de células mononucleares periféricas de mujeres controles. Observaron que el líquido peritoneal de las pacientes sobre células normales llevaba la expresión de estos antígenos de superficie a porcentajes semejantes a los observados en endometriosis y sugirieron que este efecto está mediado por la IL-10.

Por otra parte, en nuestras evaluaciones hemos observado que los macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis producen cantidades significativamente más elevadas de IL-1 con relación a la producida por los macrófagos de mujeres normales. Este incremento es más evidente en los estadios leves de la enfermedad(16).

Coincidentemente con nuestras observaciones, otros autores(21) han sugerido que en los estadios tempranos de la endometriosis las lesiones proliferan de forma muy activa y los macrófagos están más activados. Por el contrario, cuando la enfermedad se hace crónica y las lesiones han alcanzado dimensiones macroscópicas, el crecimiento celular disminuye y la "actividad inflamatoria peritoneal disminuye".

Basándonos en estudios previos sobre el efecto de las hormonas sexuales esteroideas sobre la funcionalidad de macrófagos peritoneales murinos(22-24) y sabiendo que la endometriosis es una enfermedad estrógeno-dependiente, decidimos evaluar los niveles de estradiol en el líquido peritoneal de estas pacientes. Hallamos que la concentración peritoneal de estradiol en pacientes con endometriosis leve duplicaba la hallada en mujeres controles, y en pacientes con endometriosis avanzada, estos niveles centuplicaban los niveles normales. Si bien en estas pacientes los niveles de estrógenos no

están alterados en sangre periférica, corroboramos que el ambiente peritoneal hiperestrogénico sería un factor coadyuvante para el desarrollo de la enfermedad(25). Estos altos niveles de estrógenos podrían tener origen en la producción de este esteroide por parte del tejido endometrial ectópico(26) y también por los mismos macrófagos peritoneales puesto que se ha comprobado que ambos poseen la enzima aromatasa P450(27,28).

Además, se ha demostrado que los macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis presentan una mayor expresión de receptores para estrógeno (ER α y ER β)(29,30) y que son activados por el 17- β estradiol, observándose no sólo una modificación en su morfología, sino en su funcionalidad(31).

Estos datos apoyan nuestros resultados, puesto que las mayores alteraciones en cuanto al número, fagocitosis y producción de PGE $_2$ de los macrófagos peritoneales de las pacientes con endometriosis, independientemente del grado de la enfermedad, se producían en la fase folicular del ciclo menstrual, mientras que la producción de IL-1 era más elevada en la fase lútea(16).

Sharpe-Timms y cols. han identificado una proteína única, estructuralmente similar a la haptoglobina, en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis(32,33). Esta proteína se une a los macrófagos, reduce su capacidad de fagocitosis y aumenta su producción de IL-6.

Existe una amplia evidencia que apoya el concepto de que la endometriosis es una enfermedad inflamatoria pelviana. El microambiente peritoneal en estas pacientes es especialmente rico en prostaglandinas producidas principalmente por los macrófagos. En nuestros estudios hemos hallado que, si bien los niveles de PGE $_2$ aumentan en pacientes con endometriosis leve, en endometriosis severa estos niveles son mil veces mayores que los normales(34).

Estos mediadores probablemente juegan un papel central en la fisiopatología de la enfermedad, así como en secuelas clínicas del dolor y la infertilidad. Los macrófagos peritoneales de las mujeres con endometriosis expresan niveles más altos de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2)(35). Además, la IL-1 β promueve la activación de la COX-2 y aumenta la producción de PGE $_2$ (36) que activa la enzima aromatasa(37,38). Estas últimas aumentan la producción de estradiol (E $_2$) y éste estimula la síntesis de PGE $_2$, completándose un bucle de retroalimentación positiva que promueve el aumento de la biodisponibilidad local de E $_2$ (39,40) (Figura 1). Esta vía destaca la interacción de la dependencia de estrógeno y la inflamación en la endometriosis.

La inflamación no sólo está presente en el microambiente peritoneal, sino también en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis. Se

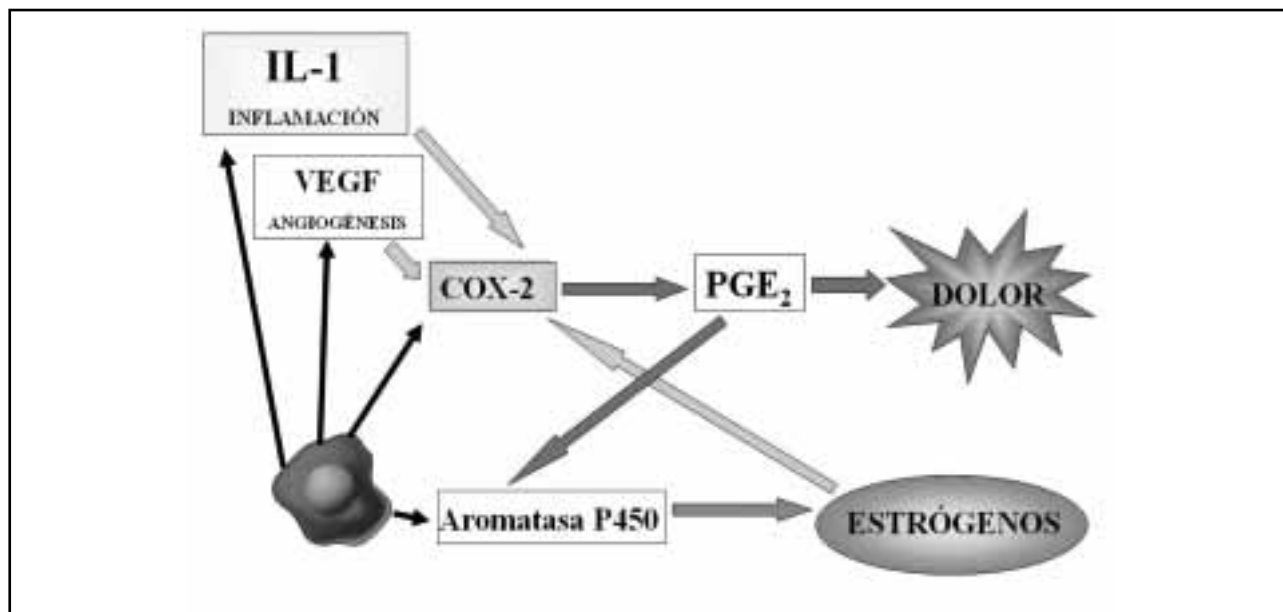


Figura 1. Los macrófagos peritoneales producen IL-1 (citoquina proinflamatoria) y VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular), ambos factores estimulan la actividad de la enzima COX-2. Esta incrementa la producción de PGE₂ que al mismo tiempo provocará un aumento del dolor y estimulará la actividad de la aromatasa P450 (presente en macrófagos y en endometrio ectópico). Estos factores contribuyen al aumento de los niveles de estrógenos intraperitoneales para crear un ciclo de retroalimentación positiva sobre la producción de COX-2 y un estado inflamatorio persistente.

ha descrito un aumento en el número de macrófagos en mujeres con endometriosis durante la fase proliferativa con respecto a lo observado en el mismo tejido de mujeres normales(41).

El entorno inflamatorio dentro de la pelvis puede contribuir a la fisiopatología de la percepción del dolor en mujeres con síntomas de endometriosis. Se cree que las fibras nerviosas de los implantes endometriósicos afectan a las neuronas de la raíz dorsal del sistema nervioso central, lo que produce un aumento de la percepción del dolor en estas pacientes(42).

En el tejido ectópico, el número de macrófagos se correlacionaría con el número de fibras nerviosas por lo cual se plantea la posibilidad de que éstos pudieran favorecer el desarrollo de la inervación y, consecuentemente, el dolor asociado a la enfermedad(43).

Otro de los factores solubles producidos por los macrófagos que influyen en el desarrollo de las lesiones endometriósicas es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), ya que este facilitaría la neoangiogénesis necesaria para el mantenimiento de los implantes de tejido ectópico. Diversos autores coinciden en que en la endometriosis los macrófagos peritoneales son los principales productores de factores proangiogénicos(44,45) y en particular, el grupo de McLaren y cols. ha demostrado que la producción de VEGF por los macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis está regulado por esteroides sexuales(46).

En nuestras evaluaciones realizadas con macrófagos peritoneales de ratones con endometriosis, luego de 30 días de inducidas las lesiones quirúrgicamente, observamos que la producción de VEGF es significativamente mayor en ratones con endometriosis respecto de ratones controles ($p < 0,05$ vs. Control) (datos no publicados).

Actualmente se sabe que existen al menos dos poblaciones distintas de macrófagos, los M1, que son aquellos que se activan de manera clásica, responden a productos microbianos o IFN- γ , tienen alta capacidad de presentar antígenos; producen IL-12 y 23 y al activarse liberan gran cantidad de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (o ROS: *reactive oxygen species*). Son considerados potentes células efectoras, capaces de matar a microorganismos intracelulares y células tumorales y de producir grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, existen macrófagos M2 que se activan por una vía alternativa en presencia de IL-4, 10 y 13, por glucocorticoides, complejos antígenos-anticuerpos, ligandos de receptores tipo Toll (TLR) y esteroides. Estos producen un tipo de respuesta antiinflamatoria o tolerogénica que favorece el desarrollo de la inmunidad adaptativa Th2, promueven la angiogénesis y la reparación y remodelación tisular(47,48).

Sobre la base de estos datos, es posible pensar que durante el desarrollo de la endometriosis el perfil de subpoblaciones macrofágicas peritoneales se vaya mo-

dificando acorde disminuya el estado inflamatorio y la enfermedad se haga crónica(49,50).

Células “*natural killer (NK)*”

En una respuesta inmunológica normal, las células endometriales ectópicas deberían ser eliminadas de la cavidad peritoneal por la actividad de las células NK. Más aún, se ha comprobado que las células NK de mujeres normales son capaces de lisar los implantes endometriósicos(51). Entonces surge un interrogante: *¿existe una deficiencia numérica o funcional de las células NK en las pacientes con endometriosis?*

En cuanto a la posible alteración cuantitativa de estas células hay grandes discrepancias puesto que algunos autores han descripto disminución; otros, aumento; y otros no observaron diferencias con respecto a las mujeres normales(52). Sí, en cambio, existe una amplia concordancia en que hay una disminución de la actividad citotóxica de las NK tanto hacia el endometrio autólogo como hacia el heterólogo, por parte de las NK periféricas y peritoneales(53).

Otros datos refuerzan estas observaciones, puesto que se ha demostrado que las células NK de mujeres normales disminuyen su citotoxicidad con el agregado in vitro de suero de pacientes con endometriosis(54) y que el medio condicionado de células de estroma endometrial inhibe la actividad NK(55).

Garzetti y cols.(56) publicaron que la disminución de la citotoxicidad de las NK en pacientes con endometriosis era directamente proporcional a los niveles de estradiol en suero. Estos autores postularon también que a medida que la enfermedad se hace más severa, los niveles de E_2 plasmáticos aumentan y los de prolactina disminuyen, al tiempo que la actividad citotóxica de las NK decae, lo que sugiere también que la relación E_2 /prolactina podría emplearse como un marcador de progresión de la enfermedad(57).

Recientemente Sikora y cols.(58) publicaron una serie de posibles factores inmunorregulatorios que podrían estar disminuyendo la actividad citotóxica de las células NK en pacientes con endometriosis. Entre estos se incluyen: incremento de los receptores inhibitorios (KIR), el desequilibrio de citoquinas Th1/Th2, la presencia de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I no clásicos como el HLA-G y HLA-E en el tejido endometrial ectópico y solubles, el aumento de los niveles de IL-12p40 que actúa como un receptor soluble para la IL-12 e inhibiría su acción estimuladora de la citotoxicidad, y el aumento de la forma soluble de la molécula de adhesión intracelular-1 (sICAM-1).

La presencia de antígenos HLA-G de membrana y soluble ha sido demostrada en el endometrio ectópico y en el fluido peritoneal de pacientes con endometriosis,

y se sabe que esta molécula inhibe el ataque citotóxico al tiempo que favorece una “tolerancia inmunológica” hacia el tejido portador(59).

Además, otro factor que inhibe la actividad citotóxica de las NK que está presente en el líquido peritoneal de estas pacientes es la glicodelina A o proteína placentaria 14 (PP14). Esta proteína es producida tanto por el endometrio eutópico como el ectópico e interfiere en el reconocimiento antigénico(60,61).

Finalmente, la presencia de galectina-1 (Gal-1) en el tejido endometrial también es otro factor que inhibe el ataque de células citotóxicas y favorece el no rechazo al tejido ectópico(62).

Linfocitos T

Muchos autores han estudiado las distintas poblaciones de T (LT) en pacientes con endometriosis. Las primeras observaciones de Gleicher y cols.(63) no mostraron diferencias significativas en el número de linfocitos T. Años más tarde, sin embargo, Badawy y cols.(64) publicaron que existía un aumento de LT en el líquido peritoneal de estas pacientes y esto fue confirmado por otros grupos(65,66).

Sin embargo, en mujeres con endometriosis, la respuesta linfoproliferativa y la actividad de los LT citotóxicos está disminuida y se observan diferencias de acuerdo con los estadios de la enfermedad(52,67). Más aún, algunos autores han propuesto que la estimulación de la respuesta citotóxica hacia el endometrio ectópico con IL-2 podría emplearse terapéuticamente en estas pacientes(68).

Al igual que ocurre con la disminución de la citotoxicidad de las células NK, existen varios factores que podrían estar interviniendo para inhibir esta respuesta. Se suma el posible aumento de la muerte de los LT por apoptosis inducida por el sistema Fas/FasL. Existiría un aumento de IL-8 en el fluido peritoneal que favorecería el aumento de la expresión del ligando FasL en las células de estroma endometrial, el cual al unirse al Fas expresado en los leucocitos induciría la muerte de estos últimos(69).

En el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis existe una disminución el ratio CD4/CD8 (LT “*helper*”/LT citotóxicos) con respecto a las mujeres normales, cosa que no se observa ni en sangre periférica ni en el endometrio eutópico. Por otra parte, tanto la actividad “*helper*” de los CD4 como la citotoxicidad de los CD8 está disminuida en presencia del líquido peritoneal de estas pacientes, lo que sugiere que existe uno o más factor/es soluble/s que estarían inhibiendo la actividad de estas células. Entre los factores posibles se ha postulado a la IL-10 como responsable de estas alteraciones(70,71).

Dentro de las poblaciones de LT “*helper*” se hallan también los Th17, los cuales rápidamente inician una respuesta inflamatoria ya que mediante la producción de

IL-17 favorecen el reclutamiento y la activación de los leucocitos neutrófilos(72). Hirata y cols.(73) han demostrado el aumento de estos Th17 en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis y que la IL-17 favorece la proliferación de células de estroma endometrial, y el grupo de Velasco y cols.(74) demostró la presencia de IL-17 en el líquido de los quistes endometriósicos.

Finalmente, otra de las poblaciones de LT que merece especial atención en estas pacientes es la de los LT reguladores (LTreg), los cuales suprimen la activación del sistema inmunológico y favorecen los mecanismos de homeostasis y tolerancia inmunológica.

En relación con los LTreg, se ha visto que en estas pacientes existe una disminución de estas células en sangre periférica pero un significativo aumento en el líquido peritoneal(75). Además, mientras que en el endometrio eutópico de mujeres normales estas células disminuyen durante la fase secretoria, en las pacientes con endometriosis no se observa dicha disminución. Estas dos últimas alteraciones favorecerían los mecanismos de tolerancia y el no rechazo del tejido endometrial ectópico(76).

Linfocitos B

Algunos autores han descripto un aumento en la actividad de los linfocitos B en pacientes con endometriosis. Weed y cols.(77) demostraron la existencia de depósitos de IgG y de complemento en el endometrio eutópico y la consiguiente disminución de los niveles de complemento en el suero de estas pacientes. Estos autores postularon que el endometrio ectópico podría actuar como foráneo e inducir una respuesta autoinmune y, como consecuencia de esto, infertilidad.

La teoría de que la endometriosis puede ser una enfermedad autoinmune fue introducida por Gleicher(78), ya que, a semejanza de estas patologías, la endometriosis presenta activación policlonal de los LB, anormalidades en la funcionalidad de LT y LB, aumento de la apoptosis, daño tisular e involucra a múltiples órganos. Además, existe predisposición familiar (lo que podría implicar una base genética) y suele asociarse con otras enfermedades autoinmunes(79,80). Sin embargo, existe poca evidencia de que los niveles altos de autoanticuerpos sean prevalentes en todas las mujeres con endometriosis y que los niveles de éstos se correlacionen directamente con los grados de infertilidad(81,82).

Actualmente se pueden diferenciar al menos 3 poblaciones de LB de acuerdo con su ubicación y función: brevemente, existe una población denominada B1 de los cuales hay pocos en sangre periférica, pero abundantes en cavidad peritoneal y pleural. Son capaces de autorrenovarse localmente y su principal función es la producción de anticuerpos de tipo IgM dirigidos contra antígenos no proteicos, como polisacáridos, fosfatidilcolina y

lipopolisacáridos. No requieren colaboración de los LT y producen grandes cantidades de IgM sin necesidad de contacto con el antígeno. Otra de las poblaciones es la B2, que son los LB más abundantes en sangre periférica (90%) y tejidos linfoides secundarios. Necesitan señales coestimulatorias de los LT. Expresan receptores de LB, son capaces de producir anticuerpos antiantígenos proteicos y pueden actuar contra células encapsuladas (meningococos, neumococos). Finalmente, existen los LB de zona marginal de bazo (BZM), que están especialmente adaptados a producir grandes cantidades de IgM específica los 3 o 4 primeros días luego de la estimulación antigénica.

En pacientes con endometriosis existe un aumento en el número de LB1 del líquido peritoneal. Asimismo, el tejido endometrial ectópico comparado con el tejido eutópico presenta mayor cantidad de células plasmáticas, las cuales derivarían de estos LB1(83). En cuanto a la población de LB2, algunos autores han descripto un aumento(84-86). No existen datos acerca de los BZM en endometriosis.

Alteraciones en las citoquinas

Las citoquinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son factores solubles que median la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas.

Estas citoquinas son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por neutrófilos, células endoteliales, epiteliales, adipocitos y del tejido conjuntivo.

Su acción fundamental se observa en la regulación del mecanismo de la inflamación. Hay citoquinas proinflamatorias o Th1 y otras antiinflamatorias/tolerogénicas o Th2/Th3(87,88). Dependiendo del tipo de antígeno que produzca la estimulación del sistema inmunológico, se incrementará uno u otro tipo de citoquinas. Las Th1 inhibirán la producción de las Th2/Th3 y viceversa, sin embargo, para recuperar la homeostasis, ambos tipos de respuesta tienden a equilibrarse.

Dentro de las citoquinas tipo Th1 se hallan fundamentalmente el IFN γ , IL-1, IL-2 y TNF α , y dentro de las Th2/Th3: IL-4, IL-5, IL-10 y TGF- β .

Entre estas citoquinas, algunas de las más estudiadas con relación a la endometriosis son:

IL-1: en nuestras evaluaciones, observamos que los niveles de esta citoquina en los cultivos de macrófagos y en el líquido peritoneal se encuentran aumentados en pacientes con endometriosis leve con respecto

a los controles y a la endometriosis severa. Estos datos sustentan los hallazgos de otros autores que, aunque no agruparon a las pacientes con endometriosis de acuerdo con el grado de la enfermedad, encontraron elevada la concentración de IL-1 β en líquido peritoneal de estas pacientes con respecto a las mujeres normales(89-91).

IL-6: en comparación con los controles libres de endometriosis, el endometrio eutópico de las mujeres con esta enfermedad mostró un aumento de la producción basal de IL-6(92). La IL-6 juega un papel importante en muchas enfermedades inflamatorias crónicas y es secretada por los macrófagos, así como por las células epiteliales endometriales(93). Curiosamente, se demostró también que la IL-6 estimula significativamente la expresión de la aromatasa en cultivos de células de estroma endometrial(74).

IL-8: esta citoquina es producida por el tejido endometrial normal, se observa un aumento en su producción en la fase secretoria tardía y en la proliferativa temprana(94-96). También es producida por células mesoteliales en cultivo. Citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF α estimulan su síntesis(98). La concentración de IL-8 en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis está significativamente aumentada especialmente en los estadios avanzados de la enfermedad(97,98). Este sería un hecho relevante puesto que la IL-8 es un factor angiogénico y de este modo favorecería la neovascularización del tejido ectópico. Al mismo tiempo, esta citoquina podría facilitar el anclaje inicial de las células endometriales en la superficie peritoneal ya que estimula la adhesión de las células de estroma endometrial a la fibronectina y la actividad de metaloproteasas(99-101). El tejido endometriótico produce grandes cantidades de IL-8 y también se ha descrito un incremento en la producción de IL-8 por monocitos de sangre periférica de pacientes con endometriosis.

IL-4 e IL-10: nuestras evaluaciones preliminares revelaron que en los líquidos peritoneales de mujeres sin endometriosis, los niveles de ambas citoquinas fueron indetectables, en cambio, sí pudieron cuantificarse en pacientes con endometriosis. Se halló que los niveles de IL-4 eran mayores en los estadios leves que en los severos de la enfermedad, mientras que la IL-10 sólo se pudo cuantificar en las pacientes con endometriosis severa. La IL-4 y la IL-10(102,103) han sido involucradas en el crecimiento de las células endometriales *in vitro* y, por otro lado, inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-6 y el TNF- α (104). Los niveles de IL-10 presentes en nuestro estudio, coincidieron con los valorados por Hsu y cols.(105), quienes también encontraron niveles elevados de IL-4 en pacientes con endometriosis que atribuyeron a una acción supresora por parte de esta citoquina sobre la citotoxicidad

mediada por células T, lo que permitiría el establecimiento y el crecimiento del endometrio ectópico en la cavidad peritoneal.

Actualmente se dice que la endometriosis es una enfermedad “inflamatoria” pero con un perfil de citoquinas Th2 (antiinflamatorias)(106). Es probable que el tipo de citoquinas predominante dependa del estadio de la enfermedad, ya que –como ya mencionamos– cuando las lesiones son más activas, los macrófagos están más activados, mientras que cuando la enfermedad se hace crónica, la actividad inflamatoria peritoneal disminuye.

IL-12: esta citoquina es producida por macrófagos y monocitos y regula la proliferación y citotoxicidad de las células NK. Asimismo, estimula la secreción de varias citoquinas. Se ha demostrado su presencia en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis y normales(107). En particular, se ha observado que la concentración de la subunidad p40 de la IL-12 estaría muy aumentada en las pacientes con endometriosis. Esta subunidad inhibe la actividad de las células NK y disminuye los receptores de IL-12 en estas células(108).

VEGF: se demostró que los implantes endometrióticos presentan un mecanismo de neovascularización mediado por el VEGF; se han encontrado altos niveles de esta citoquina en el líquido peritoneal de pacientes con esta enfermedad(109,110). Tanto el tejido endometriótico como los macrófagos peritoneales estarían produciendo VEGF en estas pacientes(111,112). Además el VEGF es estimulado por IL-1 y ambas citoquinas son promitogénicas y antiapoptóticas, por lo que favorecerían el crecimiento, la vascularización y la supervivencia del tejido endometrial ectópico(113).

Estrógenos y respuesta inmunológica

Es un hecho conocido que los esteroides sexuales actúan sobre el sistema inmunológico(114). Se ha demostrado que tanto los estrógenos como los andrógenos inhiben la proliferación y aumentan la apoptosis de LT de manera dosis y tiempo-dependiente. Además, la progesterona aumenta la apoptosis tanto de LT como de LB(115,116).

Asimismo, las mujeres presentan un perfil de citoquinas Th2(117). Burger y Dayer(118) han sugerido que el estradiol inhibe la producción y liberación de las citoquinas de tipo Th1 (IFN γ y IL-2) mientras que la testosterona inhibe las citoquinas de tipo Th2 (IL-4). También se ha visto que en mujeres durante la fase luteínica (días 6-9 posterior al pico de LH) aumenta la respuesta de tipo Th2(119).

Como se mencionó, la endometriosis es una enfermedad estrógeno-dependiente y en nuestras evaluaciones hemos corroborado altos niveles de E₂ en el líquido peritoneal de estas pacientes. El aumento en los niveles

de E_2 estaría favorecido por la producción autocrina por parte del endometrio ectópico(120). Este esteroide favorecería no sólo la proliferación del tejido endometrial, sino que inhibiría el ataque por parte del sistema inmunológico(121,122).

En una sección previa se ha comentado el efecto de los estrógenos sobre los macrófagos peritoneales.

Además, existe una relación inversa entre niveles de E_2 y disminución de la actividad de NK(123-125). Luego del tratamiento con agonistas de GnRH aumenta el número y la actividad de NK pero no se sabe si por acción directa o por la disminución de E_2 (126).

Una recopilación realizada por Straub(122) muestra cómo los estrógenos actúan sobre las distintas subpoblaciones de linfocitos T y particularmente cómo su acción sobre los LTh17 y LTreg favorecen el desarrollo de una inflamación crónica. Asimismo, los estrógenos afectan la actividad de células NK, la producción de anticuerpos y la liberación de citoquinas. En la Figura 2 se esquematiza el efecto sobre distintas células inmunocompetentes de niveles altos de estradiol (semejantes a los observados en la preñez) y los niveles bajos (semejantes a los hallados en la posmenopausia).

Conclusiones finales

En las pacientes con endometriosis existen evidentes alteraciones inmunológicas que podrían ser causa o consecuencia de la presencia de tejido endometrial ectópico y del incremento de los niveles de estrógenos en la cavidad peritoneal.

Las CD y la presentación antigénica a cargo de estas células se hallan disminuidas. La población

de macrófagos peritoneales está aumentada con respecto a las mujeres normales al mismo tiempo que existe un incremento en la producción de IL-1, VEGF, PGE_2 y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que favorece la proliferación y angiogénesis de los implantes endometriósicos y el establecimiento de una inflamación crónica. Estas células también tienen disminuida su capacidad de presentar antígenos a los LT.

Estas alteraciones en la población macrófagica podrían deberse al aumento de E_2 en el líquido peritoneal observado en pacientes con endometriosis, sumado al hecho de que los propios macrófagos poseen aromatasa P450, por lo que podrían tener una producción autocrina de estrógenos.

Asimismo, tanto los estrógenos como otros factores solubles tales como PP14, HLA-Gs y citoquinas de tipo Th_2 inducirían una marcada disminución en la actividad de células NK y LT citotóxicos. El incremento de LTreg junto con la expresión Gal-1 y HLA de tipo I no clásicos por parte del tejido endometrial ectópico son otros factores inhibitorios de la citotoxicidad.

Si bien se trata de una enfermedad inflamatoria, en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis predominan las citoquinas de tipo Th_2 que favorecen la tolerancia inmunológica hacia los implantes.

Finalmente, existiría un aumento de la población de LB1 que sería responsable del aumento de anticuerpos de tipo IgM observado en muchas pacientes con endometriosis. Todas estas alteraciones se resumen y esquematizan en la Figura 3.

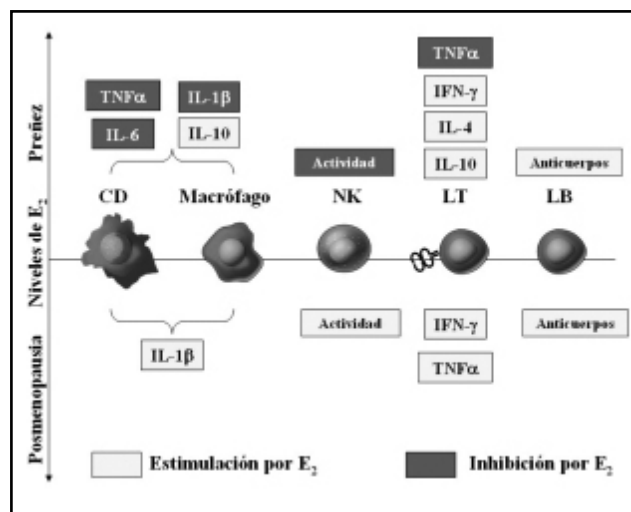


Figura 2. Efecto de los estrógenos sobre las distintas subpoblaciones leucocitarias y sus productos (basado en el esquema publicado por Straub, 2007).

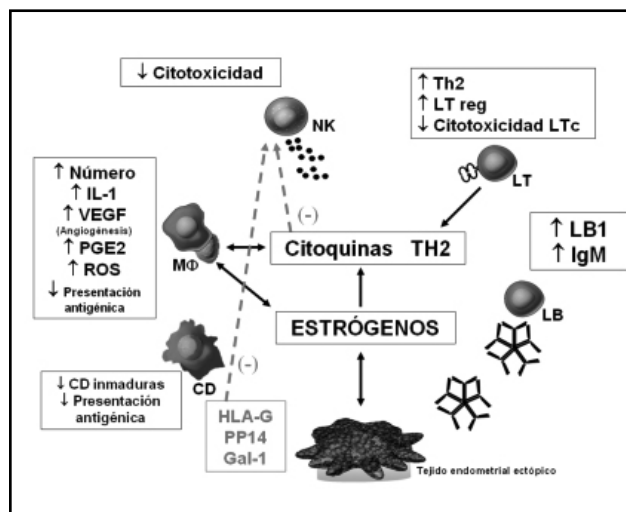


Figura 3. Esquema de las alteraciones inmunológicas presentes en la cavidad peritoneal de las pacientes con endometriosis.

Referencias

- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364:1789-99.
- Alvarez P, Chen X, Hendrich J, et al. Ectopic uterine tissue as a chronic pain generator. *Neuroscience*. 2012;225:269-82.
- Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril*. 2011;96:366-73.
- Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24:235-58.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364:1789-99.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1927;14:422-69.
- Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol*. 1986;93:859-62.
- Braun DP, Dmowski WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1998;10:365-9.
- Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod*. 2001;16:1802-8.
- Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2000;74:760-6.
- Tariverdian N, Siedentopf F, Rucke M, et al. Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2009;80:80-90.
- Schulke L, Berbic M, Manconi F, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24:1695-703.
- Fainaru O, Adini A, Benny O, et al. Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J*. 2008;22:522-9.
- Coronato S, Laguens GE, Spinelli OM, Salas MA, Di Girolamo W. Dendritic cells and their role in pathology. *Medicina (Bs. As.)*. 1998;58:209-18.
- Na YJ, Jin JO, Lee MS, Song MG, Lee KS, Kwak JY. Peritoneal fluid from endometriosis patients switches differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *J Reprod Immunol*. 2008;77:63-74.
- Raiter-Tenenbaum A, Barañao RI, Etchepareborda JJ, Meresman GF, Rumi LS. Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 1998;261:147-57.
- Tenenbaum A, Barañao RI, Etchepareborda JJ, Lavarello M, Keserü E, Rumi LS. Functional alterations of peritoneal macrophages in patients with mild endometriosis. In: Rodríguez Armas, ed. *Fertility and Sterility. Progress in Research and Practice*. Parthenon Publications, 1994; pp. 112-8.
- Yamamoto Y, Maeda N, Izumiya C, et al. Decreased human leukocyte antigen-DR expression in the lipid raft by peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2007.
- Kusume T, Maeda N, Izumiya C, et al. Human leukocyte antigen expression by peritoneal macrophages from women with pelvic endometriosis is depressed but coordinated with costimulatory molecule expression. *Fertil Steril*. 2005;83 Suppl 1:1232-40.
- Lee KS, Baek DW, Kim KH, et al. IL-10-dependent down-regulation of MHC class II expression level on monocytes by peritoneal fluid from endometriosis patients. *Int Immunopharmacol*. 2005;5:1699-712.
- Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril*. 1998;70:425-31.
- Barañao RI, Tenenbaum A, Meresman GF, Rumi LS. Murine peritoneal macrophages in syngeneic and allogeneic pregnancies. *Theriogenology*. 1996;46:1257-66.
- Barañao RI, Tenenbaum A, Sales ME, Rumi LS. Functional alterations of murine peritoneal macrophages during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1992;27:82-6.
- Barañao RI, Tenenbaum A, Rumi LS. Effects of sexual steroid hormones on the functionality of murine peritoneal macrophages. *Steroids*. 1991;56:481-5.
- Tenenbaum A, Barañao RI, Etchepareborda JJ, Lavarello M, Keserü E, Rumi LS. Alteraciones en macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis y su relación con los niveles estrogénicos. *Medicina (Bs. As.)*. 1992;52:452-3.
- Bulun SE, Fang Z, Imir G, et al. Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2004;22:45-50.
- Schmidt M, Naumann H, Weidler C, Schellenberg M, Anders S, Straub RH. Inflammation and sex hormone metabolism. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1069:236-46.
- Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;86:225-30.
- Montagna P, Capellino S, Villaggio B, et al. Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation. *Fertil Steril*. 2008;90:156-64.
- Capellino S, Montagna P, Villaggio B, et al. Role of estrogens in inflammatory response: expression of estrogen receptors in peritoneal fluid macrophages from endometriosis. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1069:263-7.
- Hong M, Zhu Q. Macrophages are activated by 17beta-estradiol: possible permissive role in endometriosis. *Exp Toxicol Pathol*. 2004;55:385-91.
- Sharpe-Timms KL, Ricke EA, Piva M, Horowitz GM. Differential expression and localization of de-novo synthesized endometrial haptoglobin in endometrium and endometrial lesions. *Hum Reprod*. 2000;15:2180-5.
- Sharpe-Timms KL, Piva M, Ricke EA, Surewicz K, Zhang YL, Zimmer RL. Endometrial lesions synthesize and secrete a haptoglobin-like protein. *Biol Reprod*. 1998;58:988-94.

34. Tenenbaum A, Baraño RI, Meresman GF, Etchepareborda JJ, Lavarello M, Rumi LS. Evaluación de los niveles de prostaglandina E2 en fluido peritoneal y macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis. Abstract Book of the VII Argentine Congress of Fertility and Sterility. 1993;43 (abstr).
35. Wu MH, Sun HS, Lin CC, et al. Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2002;8:1103-10.
36. Neeb L, Hellen P, Boehnke C, et al. IL-1beta stimulates COX-2 dependent PGE(2) synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. *PLoS.One*. 2011;6:e17360.
37. Attar E, Tokunaga H, Imir G, et al. Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:623-31.
38. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, et al. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2002;55:21-33.
39. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*. 2008;90:247-57.
40. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, et al. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2002;55:21-33.
41. Berbic M, Schulke L, Markham R, Tokushige N, Russell P, Fraser IS. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24:325-32.
42. Alvarez P, Chen X, Hendrich J, et al. Ectopic uterine tissue as a chronic pain generator. *Neuroscience*. 2012;225:269-82.
43. Tran LV, Tokushige N, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24:835-41.
44. Barcz E, Kaminski P, Marianowski L. VEGF concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Ginekol Pol*. 2001;72:442-8.
45. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod*. 1998;13:1686-90.
46. 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;11:220-3.
47. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23:549-55.
48. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-61.
49. Capobianco A, Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front Immunol*. 2013;4:9.
50. Bacci M, Capobianco A, Monno A, et al. Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol*. 2009;175:547-56.
51. Vigano P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 1991;56:894-9.
52. Dmowski WP, Braun DP. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:245-63.
53. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1992;58:290-5.
54. Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167:257-61.
55. Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B, et al. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36:295-300.
56. 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;81:665-8.
57. Provinciali M, Di Stefano G, Muzzioli M, Garzetti GG, Ciavattini A, Fabris N. Relationship between 17-beta-estradiol and prolactin in the regulation of natural killer cell activity during progression of endometriosis. *J Endocrinol Invest*. 1995;18:645-52.
58. Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. *Curr Med Chem*. 2011;18:200-8.
59. Maeda N, Izumiya C, Taniguchi K, Matsushima S, Fukaya T. Role of NK cells and HLA-G in endometriosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4:1568-81.
60. Koninckx PR, Riittinen L, Seppala M, Cornillie FJ. CA-125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis. *Fertil Steril*. 1992;57:523-30.
61. Meola J, Dentillo DB, Rosa e Silva JC, et al. Glycodelin expression in the endometrium of healthy women and in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2009;91:1676-80.
62. Baston JJ, Ricci A, Bilotas M, et al. Galectin-1 expression in stroma of lesions and endometrium from patients with endometriosis. *Biocell*. 2011;35:A296.
63. Gleicher N, Dmowski WP, Siegel I, et al. Lymphocyte subsets in endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984;63:463-6.
64. Badawy SZ, Cuenca V, Marshall L, Munchback R, Rinas AC, Coble DA. Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril*. 1984;42:704-8.
65. 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.
66. Hill JA, Anderson DJ. Lymphocyte activity in the presence of peritoneal fluid from fertile women and infertile women with and without endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161:861-4.

67. Gilmore SM, Aksel S, Hoff C, Peterson RD. In vitro lymphocyte activity in women with endometriosis--an altered immune response? *Fertil Steril.* 1992;58:1148-52.
68. Melioli G, Semino C, Semino A, Venturini PL, Ragni N. Recombinant interleukin-2 corrects in vitro the immunological defect of endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1993;30:218-27.
69. Selam B, Kayisli UA, Akbas GE, Basar M, Arici A. Regulation of FAS ligand expression by chemokine ligand 2 in human endometrial cells. *Biol Reprod.* 2006;75:203-9.
70. 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;12:2528-33.
71. Szylo K, Tchorzewski H, Banasik M, Glowacka E, Lewkowicz P, Kamer-Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm.* 2003;12:131-8.
72. Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2011;65:1-10.
73. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, et al. Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology.* 2008;149:1260-7.
74. Velasco I, Acien P, Campos A, Acien MI, Ruiz-Macia E. Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *J Reprod Immunol.* 2010;84:199-205.
75. Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, et al. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod.* 2010;25:900-7.
76. Berbic M, Fraser IS. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *J Reprod Immunol.* 2011;88:149-55.
77. Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol.* 1980;23:885-93.
78. Gleicher N, el Roeiy A, Confino E, Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol.* 1987;70:115-22.
79. Gleicher N. Autoantibodies in endometriosis--epiphenomenon? *Fertil Steril.* 1990;54:543-4.
80. Gleicher N, Pratt D. Abnormal (auto)immunity and endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 1993;40 Suppl:S21-S27.
81. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50:48-59.
82. Olovsson M. Immunological aspects of endometriosis: an update. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66 Suppl 1:101-4.
83. Hever A, Roth RB, Hevezi P, et al. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:12451-6.
84. Startseva NV. Clinical immunological aspects of genital endometriosis. *Akush Ginekol (Mosk).* 1980;23:6.
85. Gagne D, Rivard M, Page M, Shazand K, Hugo P, Gosselin D. Blood leukocyte subsets are modulated in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2003;80:43-53.
86. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50:48-59.
87. Poncin S, Lengele B, Colin IM, Gerard AC. Differential interactions between Th1/Th2, Th1/Th3, and Th2/Th3 cytokines in the regulation of thyroperoxidase and dual oxidase expression, and of thyroglobulin secretion in thyrocytes in vitro. *Endocrinology.* 2008;149:1534-42.
88. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol.* 2001;13:219-27.
89. Hill JA, Anderson DJ. Lymphocyte activity in the presence of peritoneal fluid from fertile women and infertile women with and without endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161:861-4.
90. Fakih H, Baggett B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO. Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril.* 1987;47:213-7.
91. Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M. Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167:265-70.
92. Tsudo T, Harada T, Iwabe T, et al. Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil Steril.* 2000;73:205-11.
93. Martinez S, Garrido N, Coperias JL, et al. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Hum Reprod.* 2007;22:836-42.
94. Arici A, Head JR, MacDonald PC, Casey ML. Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 1993;94:195-204.
95. Arici A, Seli E, Senturk LM, Gutierrez LS, Oral E, Taylor HS. Interleukin-8 in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1783-7.
96. Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Oral E, Olive DL. Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1201-5.
97. Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ, Olive DL. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:40-5.
98. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 1998;69:924-30.
99. Garcia-Velasco JA, Arici A. Interleukin-8 stimulates the adhesion of endometrial stromal cells to fibronectin. *Fertil Steril.* 1999;72:336-40.
100. Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann NY Acad Sci.* 2002;955:101-9.
101. Mulayim N, Savlu A, Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Arici A. Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleu-

- kin-8. *Fertil Steril*. 2004;81 Suppl 1:904-11.
102. Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174:1522-6.
103. 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;12:2528-33.
104. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991;147:3815-22.
105. Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 1997;67:1059-64.
106. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Jr., Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007;22:1373-9.
107. Zeyneloglu HB, Senturk LM, Seli E, Bahtiyar OM, Olive DL, Arici A. The peritoneal fluid levels of interleukin-12 in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1998;39:152-6.
108. Mazzeo D, Vigano P, Di Blasio AM, Sinigaglia F, Vignali M, Panina-Bordignon P. Interleukin-12 and its free p40 subunit regulate immune recognition of endometrial cells: potential role in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:911-6.
109. 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;11:220-3.
110. Barcz E, Kaminski P, Marianowski L. VEGF concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Ginek Pol*. 2001;72:442-8.
111. 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;11:220-3.
112. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod*. 1998;13:1686-90.
113. Bilotas M, Meresman G, Buquet R, Sueldo C, Baraño RI. Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *J Reprod Immunol*. 2010;84:193-8.
114. Baraño RI. Hormonas sexuales y respuesta inmunológica. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*. 2009;XVI:20-30.
115. McMurray RW. Sex hormones in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Front Biosci*. 2001;6:E193-E206.
116. McMurray RW, Suwannaroj S, Ndebele K, Jenkins JK. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology*. 2001;69:44-58.
117. Giltay EJ, Fonk JC, von Blomberg BM, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJ. In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1648-57.
118. Burger D, Dayer JM. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Ann NY Acad Sci*. 2002;966:464-73.
119. Giron-Gonzalez JA, Moral FJ, Elvira J, et al. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *Eur J Endocrinol*. 2000;143:31-6.
120. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, et al. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2002;55:21-33.
121. Ferguson MM, McDonald FG. Oestrogen as an inhibitor of human NK cell cytotoxicity. *FEBS Lett*. 1985;191:145-8.
122. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*. 2007;28:521-74.
123. 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;81:665-8.
124. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Muzzioli M, Di Stefano G, Fabris N. Natural killer activity in stage III and IV endometriosis: impaired cytotoxicity and retained lymphokine responsiveness of natural killer cells. *Gynecol Endocrinol*. 1995;9:125-30.
125. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;96:21-34.
126. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Muzzioli M, Di Stefano G, Fabris N. Natural cytotoxicity and GnRH agonist administration in advanced endometriosis: positive modulation on natural killer activity. *Obstet Gynecol*. 1996;88:234-40.