

DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIVERSOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO, DE LAS METALOPROTEASAS Y DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA ENDOMETRIOSIS. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN CON ALGUNOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS.

LUIS ANDRÉS RAMÓN NÚÑEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 15
d'abril de 2011 davant un tribunal format per:

- Dra. Concepción Abad Mazario
- Dr. Pascual Bolufer Gilabert
- Dr. Edelmiro Réganon Salvador
- Dra. Pilar Sánchez Gómez
- Dr. Antonio Cano Sánchez

Va ser dirigida per:

Dra. Amparo Estellés Cortés

Dr. Francisco España Furió

Dr. Juan Gilabert Estellás

©Copyright: Servei de Publicacions

Luis Andrés Ramón Núñez

I.S.B.N.: 978-84-370-8216-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I
BIOLOGIA MOLECULAR



**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIVERSOS
COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO, DE LAS
METALOPROTEASAS Y DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA
ENDOMETRIOSIS.
CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN CON ALGUNOS
POLIMORFISMOS ESTUDIADOS.**



Tesis doctoral presentada por
Luis Andrés Ramón Núñez
Valencia, 2011.

Dña. AMPARO ESTELLÉS CORTÉS, Doctor en Medicina y Cirugía, y Médico Adjunto de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital LA FE de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada:

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIVERSOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO, DE LAS METALOPROTEASAS Y DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA ENDOMETRIOSIS. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN CON ALGUNOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS.”

Ha sido realizada bajo mi dirección por el licenciado en Ciencias Biológicas, Don LUIS ANDRÉS RAMÓN NÚÑEZ.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Enero de dos mil once.

Fdo: Dra Amparo Estellés Cortés

Don FRANCISCO ESPAÑA FURIÓ, Doctor en Ciencias Químicas, y Adjunto de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital LA FE de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada:

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIVERSOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO, DE LAS METALOPROTEASAS Y DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA ENDOMETRIOSIS. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN CON ALGUNOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS.”

Ha sido realizada bajo mi dirección por el licenciado en Ciencias Biológicas, Don LUIS ANDRÉS RAMÓN NÚÑEZ.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Enero de dos mil once.

Fdo: Dr Francisco España Furió

Don JUAN GILABERT ESTELLÉS, Doctor en Medicina y Cirugía, y Médico Adjunto del Servicio de Ginecología del Hospital LA FE de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada:

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DIVERSOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO, DE LAS METALOPROTEASAS Y DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA ENDOMETRIOSIS. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN CON ALGUNOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS.”

Ha sido realizada bajo mi dirección por el licenciado en Ciencias Biológicas, Don LUIS ANDRÉS RAMÓN NÚÑEZ.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Enero de dos mil once.

Fdo: Dr Juan Gilabert Estellés

Para Nati

Para mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Gracias a los doctores Amparo Estellés Cortés, Francisco España Furió y Juan Gilabert Estellés por su dirección, sobretodo por sus correcciones. También al doctor Ramiro Jover por aceptar ser mi tutor en la presente tesis. Al personal del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital La Fe, los doctores Edelmiro Réganon, Virtudes Vila, Teresa Santos y Juana Vallés. También agradecer al resto de compañeros del centro su amistad.

Gracias a los doctores Concepción Abad, Justo Aznar, Pascual Bolufer, Antonio Cano, Javier Corral, Teresa Donato, Helena Mira, Edelmiro Réganon, Pilar Sánchez y Vicente Vicente por aceptar formar parte del tribunal de esta tesis. Agradecer especialmente a los doctores Edelmiro Réganon, Pilar Sánchez y Vicente Vicente, evaluadores de esta tesis y también, por adelantado, a todos los que pasen a ser miembros del tribunal definitivo.

AGRADECIMIENTOS (versión on-line)

En primer lugar quisiera agradecer a Amparo su confianza para realizar esta tesis. Tras ocho años trabajando juntos es como una segunda madre, y que menos que como madre confie en mi. También agradecer a Paco y Juan aceptar ser mis codirectores de tesis y el tiempo dedicado, sobretodo en las correcciones. A Ramiro también por su amistad, interés y aceptar ser mi tutor para la presente tesis.

Al personal del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital La Fe, Edelmiro, Virtu, Juana y Teresa por sus consejos y ánimos. Edelmiro se acaba de jubilar, me da envidia, no sé si los de mi generación nos podremos jubilar algún día.

Tampoco me puedo olvidar de las técnicas, enfermeras y auxiliares que han trabajado en nuestro grupo, Rosa, Úrsula, Pilar, Araceli, Hermi y Nuria. Ni de mis compañeros del Centro de Investigación, algunos hace tiempo que se fueron y se les echa de menos, Reme (seriedad), Chema (más yo que yo mismo), Raúl (inteligencia), Aitana (social), Silvia (hermana), Pili (jefa), Toni (humor), Marta (bondad), Paz (agresividad),

Belén (coherencia), Ana (invisibilidad), Esther (hiperactividad), Helena (más rápido), Roque (puntualidad), Celia (eficacia), Carla (sonrisa), Nati (vida), Raquel (Jerica por aquí, Jérica por allá), Ester (1, 2, 3 sufridora), Lorena (amistad), Roger (silencio), David (actividad, con mucha precariedad), Cecilia (fallas) y Jose (chismes) por su apoyo personal. A todos gracias por hacerme sonreír por los pasillos. Gracias por acompañarme y darme conversación durante esos momentos de adicción a la máquina de café.

A Isidro, del Servicio de Hematología de este hospital, gracias por todo, es imposible pagarte todo lo que te debo.

A mis padres, Juan y Rosa, gracias por soportarme hasta pasados los treinta en casa, que no es poco. A mis hermanos, Juan y Roberto, por hacerme la vida mucho más entretenida durante este tiempo. A mis cuñadas Sandra y Amparo, por compartir sus vidas con nosotros. A mi sobrina Alexandra porque, aunque pega mucho, es una alegría para toda la familia. En la actualidad estamos trabajando en su comportamiento, ahora después de pegarte te pide perdón.

A Nati, por soportarme los últimos ocho años, aunque ahora sea en la distancia. A mis suegros, Encarna y Patro, por haber criado a mi compañera en la vida.

A mis iaios Juan y Trini y mis abuelos Patricio y Rosa, os echo de menos. A mis tíos y primos, Luis, Ame, Pepito, David, María, M^a Carmen, Óscar, Geli, Emilio, Alejandro y Patri, no nos vemos todo lo que podríamos pero estamos ahí cuando nos necesitamos.

A mis amigos de Benicalap, Jose, Noe, Victor, Sonia, Israel, Marian, Andreu, Daria, Alberto, Maria, Sergio, Marina, Tommy, Lilian, Rojas y a los tres eternos solteros Óscar, Rubén y David, por alegrarme la vida, sobretodo los fines de semana. Chicos, sin vosotros ya hace años que habría acabado la tesis. A mis amigas de la Universidad Emma y Virtu, después de tantos años mantenemos contacto.

A los amigos de Valencia de Nati, que a estas alturas también son un poco míos. Moises, Raquel, Fermín, Silvia (¿otra vez?), Hugo, Rafa, JuanRa, Dani, Yolanda, Elena y Vicente. También quiero agradecer a los familiares de Nati su apoyo durante el último

año, ha sido muy importante para nosotros, especialmente a Paco, Pili y Ana María, por todas las horas que han compartido con Nati y Encarna. Gracias. No puedo olvidarme de sus primos y amigos de Albacete y El Ballestero, más de treinta primos hermanos... Daos todos por agradecidos. Solo saludar a mis tres favoritos David, Tomasito y Pepito, se que está mal, pero son mis agradecimientos y nunca he sido políticamente correcto.

A nuestros vecinos Lauren, Amparo, Ana y Raquel por no rendirse al “lado oscuro”. También, especialmente, a Ana Monterde y Rafael Calderón por no dejarnos solos, además sin necesidad, ya que ellos no viven en el infierno. En este punto hay que aclarar que el infierno, aunque de momento tiene luz, se puede quedar a oscuras. ¿Vale la pena vivir en un infierno a oscuras? No, ni siquiera con luz, por eso hace tiempo que, aprovechando que Nati está en Madrid, volví a casa de mis padres. Agradeceros a todos que permanezcais a nuestro lado. Del resto de habitantes del infierno solo puedo decir que están justo donde se merecen.

Tras este último y encriptado agradecimiento no me quiero olvidar de los doctores Concepción Abad, Justo Aznar, Pascual Bolufer, Antonio Cano, Javier Corral, Teresa Donato, Helena Mira, Edelmiro Réganon, Pilar Sánchez y Vicente Vicente por aceptar formar parte del tribunal de esta tesis. Agradecer especialmente a los doctores Edelmiro Réganon, Pilar Sánchez y Vicente Vicente, evaluadores de esta tesis.

Este trabajo en realidad es un compendio de todos los trabajos relacionados con la endometriosis que se han realizado por el grupo de la doctora Estellés desde mi llegada, en enero del 2003, hasta casi la actualidad. Así pues, muchas manos y cabezas han intervenido en estos trabajos. La doctora Estellés además de ser la principal cabeza pensante, junto con las técnicas, ha cogido la pipeta y realizado múltiples ELISAs, los doctores Gilabert Aguilar y Gilabert Estellés nos han proporcionado las muestras durante todos estos años y han dedicado parte de su tiempo al diseño experimental, la doctora Remedios Castelló me introdujo al mundo de la PCR cuantitativa y procesó muchas muestras de endometrio, el doctor Jose María Landete, en su corta estancia, realizó múltiples extracciones de DNA y el doctor Raúl Cosín realizó la determinación de los polimorfismos del VEGF-A y toda la parte de cultivos. Actualmente es la doctora Aitana Braza quien realiza esta parte de cultivos.

Este trabajo ha sido financiado por distintas becas, las del ISCIII, Fondo de Investigación Sanitaria Exp PI02/0136 (2003-2005), Exp PI05/0799 (2006-2008), Exp PI08/0185 (2009-2011), las de la Fundación Española de Trombosis y Hemostasia concedidas para la formación en hemostasia y trombosis (2006 y 2007) y concedidas para proyectos de investigación básica o clínica relacionadas con la fibrinólisis (2008 y 2009). También FEDER Red RECAVA (RD06/0014/0004).

ABREVIATURAS

3': extremo 3' de una cadena de ácido nucleico

5': extremo 5' de una cadena de ácido nucleico

aa: aminoácido/s

A: Absorbancia

A: Adenina (base nitrogenada) o Adenosina (nucleósido)

ADP: Adenosin difosfato ("Adenosine Di-Phosphate")

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico ("cyclic Adenosine MonoPhosphate")

dATPs: desoxi-adenosina trifosfato (2'-deoxyAdenosine 5'-TriPhosphate")

ANOVA: Análisis de la varianza ("ANalysis Of VAriance")

AP: Fosfatasa alcalina ("Alkaline Phosphatase").

API: Proteína activadora 1 ("Activating protein 1")

APC: Proteína C activada ("Activated Protein C")

ARE: secuencia rica en adenina y uracilo ("AU Rich Element")

Arg (también R): Arginina

Asp (también D): Ácido aspártico

ATF: Factor activador de la transcripción ("Activating Transcription Factor")

BCA: ácido biconcínico ("Bicinchoninic acid")

BSA: Albúmina de suero bovino ("Bovine Serum Albumin")

C: Citosina (base nitrogenada) o Citidina (nucleósido)

dCTPs: desoxi-citidina trifosfato (2'-deoxyCytidine 5'-TriPhosphate")

°C: grados centígrados

CD: Antígeno de diferenciación ("Cluster of Differentiation")

cm²: centímetro cuadrado

CO₂: dióxido de carbono

COX-2: cicloxigenasa-2

Cp (también Ct): Punto de corte ("Crossing-point")

Ct (también Cp): Ciclo umbral ("threshold cycle")

CSF1R (anteriormente conocido como FMS): Receptor del Factor Estimulador de Colonias tipo 1 ("Colony Stimulating Factor 1 Receptor")

Cu⁺: catión cuproso

Cu²⁺: catión cúprico

Cys (también C): Cisteína

D (también Asp): Ácido aspártico

D': valor de desequilibrio de ligamiento entre pares de SNPs

Da: Dalton

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNasa: Desoxirribonucleasa

cDNA: DNA complementario

dsDNA: DNA de doble cadena (“double-stranded DNA”)

DEPC: Dietil pirocarbonato (“DiEthyl PyroCarbonate”)

DMEM/F12: “Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12”

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (“EthyleneDiamineTetraAcetic acid”)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (“Epidermic Growth Factor”)

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (“Enzime-Linked ImmunoSorbent Assay”)

FBS: Suero Bovino Fetal (“Fetal Bovine Serum”)

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente (“Fluorescent *In Situ* Hybridization”)

bFGF (o FGF-2): Factor de crecimiento fibroblástico de tipo básico (“basic Fibroblast Growth Factor”)

Flk-1 (también llamado KDR o VEGFR-2): Quinasa de hígado fetal de tipo 1 (“Fetal Liver Kinase-1”)

Flt-1 (también llamado VEGFR-1): FMS-like tyrosine kinase 1

FMS (actualmente llamado CSF1R): oncogén homólogo al virus del sarcoma felino de McDonough (“McDonough Feline Sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog”)

Fos: Factor de transcripción Fos

G (también Gly): Glicina

G: Guanina (base nitrogenada) o Guanosina (nucleósido)

dGTPs: desoxi-guanosina trifosfato (2'-deoxyGuanosine 5'-TriPhosphate”)

g (x): (x) veces la fuerza de la gravedad, unidades de RCF

GAG: Glicosaminoglicanos

%GC: Porcentaje de bases guanina y citosina

Glu (también E): Ácido glutámico

Gly (también G): Glicina

GPI: Glicosil fosfatidil inositol (“GlycosylPhosphatidylInositol”)

h: hora/s

His (también H): Histidina

“hot-start” (PCR): PCR con inicio a elevadas temperaturas

“housekeeping” (gen): gen de expresión constitutiva

HRP: peroxidasa de rábano (“HorseRadish Peroxidase”)

H-W: Hardy-Weinberg

IC: intervalo de confianza

IL: Interleuquina

Ile (también I): Isoleucina

ISAC (Sistema): Sistema de control inmunológico de la especificidad y exactitud (“Immunological Specificity and Accuracy Control”)

Jun: Factor de transcripción Jun

JDP: Proteína de dimerización de Jun (“Jun Dimerization Protein”)

K (también Lys): Lisina

Kb: Kilobase

KCl: Cloruro de potasio

KDa: KiloDalton

KDR (también llamado FIK-1 o VEGFR-2): Receptor que contiene el dominio de inserto quinasa (“Kinase insert Domain Receptor”)

KO (ratón): modificado genéticamente para eliminar un gen concreto (“knockout”)

LBS: Sitio de unión a la lisina (“Lysine Binding Sites”)

LP: líquido peritoneal

LP0: sin líquido peritoneal

LPE: líquido peritoneal de mujeres con endometriosis

LPC: líquido peritoneal de mujeres sin endometriosis (controles)

Lys (también K): Lisina

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno (“Mitogen-Activated Protein Kinases”)

MEC: Matriz extracelular

MgCl₂: Cloruro de magnesio

min: minuto/s

mg: miligramo

ml: mililitro

mm³: milímetro cúbico

mM: milimolar

MMP: Metaloproteasa de la MEC (“Matrix MetalloProteinase”)

MT-MMPs: MMPs de tipo membrana (“Membrane-Type MMP”)

n: número de muestras

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica (“National Center for Biotechnology Information”)

ng: nanogramo

NK (células): asesinas naturales (“Natural Killer”)

nm: nanometro

NS: no significativo

nt: nucleótido/s

dNTPs: desoxi-nucleótidos trifosfato (2'-deoxyNucleotide 5'-TriPhosphate”)

OR: *odds ratio*

P: valor de p o grado de significación estadística

PAI: Inhibidor de los activadores del plasminógeno (“Plasminogen Activator Inhibitor”)

pb: pares de bases

PBS (tampón): Tampón fosfato salino (“Phosphate Buffered Saline”)

PCI (también PAI-3): Inhibidor de la proteína C (“Protein C Inhibitor”)

PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”)

PCR-RFLP: PCR seguida de RFLP.

PDF: Productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno (“Fibrin/Fibrinogen Degradation Products”)

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (“Platelet-Derived Growth Factor “)

PEA3: Factor de transcripción PEA3

PET (tampón): Tampón PBS/EDTA/Tween 20

pH: medida de la acidez, de "pondus Hydrogenium", peso del hidrógeno

PIGF: Factor de crecimiento placentario (“Placental Growth Factor “)

PMA (también llamado TPA): Acetato de forbol miristato (“Phorbol 12-Myristate 13-Acetate”)

R (también Arg): Arginina

r: coeficiente de correlación de Pearson

RFC: Fuerza centrífuga relativa (“Relative Centrifuge Force”)

RFLP: Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)

RGD (secuencia): secuencia Arg-Gly-Asp

RNA: Ácido ribonucleico

mRNA: RNA mensajero

RNasas: Ribonucleasas

rpm: Revoluciones por minuto

rs (SNP): número de referencia del SNP (“reference SNP identity”)

RT: Transcripción reversa o retrotranscripción (“Reverse Transcription”)

RT-PCR: PCR del producto de una RT

RX[R/K]R (secuencia): secuencia Arg-Xaa-[Arg/Lys]-Arg

s: segundo/s

SDS: Dodecil sulfato sódico (“Sodium Dodecyl Sulfate”)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (“Single Nucleotide Polymorphism”)

Ser (también S): Serina

Sp1: Factor de transcripción Sp1

T: Timina (base nitrogenada) o Timidina (nucleósido)

dTTPs: desoxi-timidina trifosfato (2'-deoxyThymidine 5'-TriPhosphate”)

TAE (tampón): Tampón Tris/Acetato/EDTA (“Tris-Acetate-EDTA”)

TBE (tampón): Tampón Tris/Borato/EDTA (“Tris-Borate EDTA”)

TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (“Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor”)

TAFIa: TAFI activado

Taq polimerasa: polimerasa de DNA de *Thermus aquaticus*

TGF-β: Factor transformante del crecimiento tipo β (“Transforming Growth Factor-beta”)

TIMPs: Inhibidores tisulares de las MMPs (“Tissue Inhibitor of MetalloProteinases”)

T_m: Temperatura de fusión (“Melting Temperature”)
TNF- α : Factor de necrosis tumoral tipo α (“Tumor Necrosis Factor-alpha”)
tPA: Activador tisular del plasminógeno
 sc-tPA: tPA de una cadena (“single chain tPA”)
TPA (también llamado PMA): Acetato de tetradecanoilforbol (“12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate”)
TRE: Elemento de respuesta a TPA (“TPA Response Element”)
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
 Tris-HCl (tampón): Tampón Tris clorhídrico
Tritón X-100: detergente Tritón X-100
TSP-1 (o THBS-1): Trombospondina 1 (“Thrombospondin-1”)
Tween 20: nombre comercial del surfactante polisorbato 20

U: Unidad

U: Uracilo (base nitrogenada) o Uridina (nucleósido)

UA: Unidad Arbitraria

uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (“Urokinase Plasminogen Activator”)

ATF-uPA: Fragmento aminoterminal de la uPA (“uPA Amino Terminal Fragment”)

HMW-uPA (también tc-uPA): uPA de elevada masa molecular (“High Molecular Weight uPA”)

LMW-uPA: uPA de baja masa molecular (“Low Molecular Weight uPA”)

sc-uPA: uPA de una cadena (“single chain uPA”)

tc-uPA (también HMW-uPA): uPA de dos cadenas (“two chain uPA”)

uPAR: Receptor de uPA (“uPA Receptor”)

suPAR: Receptor de uPA soluble (“soluble uPA Receptor”)

dUTPs: desoxi-uridina trifosfato (2'-deoxyUridine 5'-TriPhosphate”)

UTR: Región transcrita y no traducida (“Untranslated Region”)

UV (luz): Luz ultravioleta

Val (también V): Valina

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (“Vascular Endothelial Growth Factor”)

VEGFR: Receptor del VEGF

vs: frente a (“versus”)

X (también Xaa): cualquier aminoácido

λ : Longitud de onda

μg : microgramo

μl : microlitro

χ^2 : chi cuadrado

ÍNDICE ABREVIADO

1.-	INTRODUCCIÓN	1
2.-	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	85
3.-	MATERIAL Y MÉTODOS	91
4.-	RESULTADOS	135
5.-	DISCUSIÓN	187
6.-	CONCLUSIONES	207
7.-	BIBLIOGRAFÍA	211
8.-	APÉNDICE: TRABAJOS PUBLICADOS EN LOS QUE HA INTERVENIDO EL DOCTORANDO	253

ÍNDICE

1.-	INTRODUCCIÓN	1
1. 1.	<u>ASPECTOS GENERALES DE LA ENDOMETRIOSIS</u>	3
<i>1. 1. 1.</i>	<i>TEORIAS ETIOPATOGENICAS</i>	<i>4</i>
<i>1. 1. 1. a.</i>	<i>Por implantación y crecimiento de tejido endometrial tras un proceso de transporte</i>	<i>5</i>
<i>1. 1. 1. b.</i>	<i>Por diferenciación de tejido preexistente distinto al endometrial</i>	<i>7</i>
<i>1. 1. 1. c.</i>	<i>Teorías integradoras</i>	<i>7</i>
<i>1. 1. 2.</i>	<i>EVOLUCIÓN Y CONSOLIDACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS</i>	<i>8</i>
<i>1. 1. 3.</i>	<i>EPIDEMIOLOGÍA</i>	<i>11</i>
<i>1. 1. 4.</i>	<i>SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS</i>	<i>13</i>
1. 2.	<u>ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA FIBRINOLÍTICO</u>	14
<i>1. 2. 1.</i>	<i>ASPECTOS GENERALES DE LA FIBRINOLISIS</i>	<i>14</i>
<i>1. 2. 2.</i>	<i>PLASMINÓGENO Y PLASMINA</i>	<i>16</i>
<i>1. 2. 3.</i>	<i>ACTIVADORES FIBRINOLÍTICOS</i>	<i>18</i>
<i>1. 2. 3. 1.</i>	<i>Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)</i>	<i>18</i>
	<i>Regulación de la uPA</i>	<i>21</i>
	<i>Fisiopatología de la uPA</i>	<i>22</i>
<i>1. 2. 4.</i>	<i>INHIBIDORES FIBRINOLÍTICOS</i>	<i>23</i>
<i>1. 2. 4. 1.</i>	<i>Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1)</i>	<i>24</i>
	<i>Regulación del PAI-1</i>	<i>26</i>
	<i>Fisiopatología del PAI-1</i>	<i>27</i>
<i>1. 2. 5.</i>	<i>POLIMORFISMO -675 4G/5G DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DEL PAI-1 (rs1799768)</i>	<i>28</i>
<i>1. 2. 6.</i>	<i>FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO</i>	<i>31</i>
<i>1. 2. 7.</i>	<i>CAMBIOS FIBRINOLÍTICOS EN LA ENDOMETRIOSIS</i>	<i>32</i>
<i>1. 2. 7. 1.</i>	<i>Tejido endometrial eutópico</i>	<i>32</i>
<i>1. 2. 7. 2.</i>	<i>Tejido endometriósico</i>	<i>34</i>
<i>1. 2. 7. 3.</i>	<i>Líquido peritoneal</i>	<i>36</i>

1. 3.	<u>ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA DE LAS METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR</u>	39
1. 3. 1.	<i>LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)</i>	39
	<i>La matriz extracelular (MEC) en el endometrio</i>	41
1. 3. 2.	<i>LAS METALOPROTEASAS MATRICIALES (MMPs)</i>	44
1. 3. 2. 1.	<i>Estructura y biología de las MMPs</i>	44
1. 3. 2. 2.	<i>Clasificación de las MMPs</i>	46
1. 3. 2. 3.	<i>Regulación de las MMPs</i>	48
1. 3. 2. 4.	<i>Activación e inhibición de las MMPs</i>	48
1. 3. 2. 5.	<i>Regulación hormonal y paracrina</i>	50
1. 3. 3.	<i>POLIMORFISMO -1612 5A/6A DEL GEN DE LA MMP-3 EN LA ENDOMETRIOSIS (rs3025058)</i>	52
1. 3. 4.	<i>INHIBIDORES TISULARES DE LAS METALOPROTEASAS (TIMPs)</i>	54
1. 3. 4. 1.	<i>Estructura y biología de los TIMPs</i>	54
1. 3. 4. 2.	<i>Regulación de los TIMPs</i>	55
1. 3. 5.	<i>PAPEL DE LAS MMPs EN LA MENSTRUACIÓN</i>	56
1. 3. 6.	<i>FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA DE LAS MMPs</i>	59
1. 3. 7.	<i>CAMBIOS DE LAS MMPs EN LA ENDOMETRIOSIS</i>	60
1. 3. 7. 1.	<i>Lesiones endometriósicas y MMPs</i>	60
1. 3. 7. 2.	<i>Líquido peritoneal y MMPs</i>	62
1. 4.	<u>ENDOMETRIOSIS Y ANGIOGÉNESIS</u>	66
1. 4. 1.	<i>ASPECTOS GENERALES DE LA ANGIOGÉNESIS</i>	66
1. 4. 2.	<i>ACTIVADORES DE LA ANGIOGÉNESIS</i>	67
1. 4. 2. 1.	<i>El factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo A (VEGF-A)</i>	68
1. 4. 2. 2.	<i>Regulación del VEGF-A</i>	70
1. 4. 2. 3.	<i>El factor de crecimiento placentario (PlGF)</i>	71
1. 4. 2. 4.	<i>Receptores de VEGF-A y PlGF</i>	72
1. 4. 3.	<i>POLIMORFISMOS -460C/T (rs833061), +405C/G (rs2010963) y 936C/T (rs3025039) DEL GEN DEL VEGF-A EN LA ENDOMETRIOSIS</i>	73
1. 4. 4.	<i>INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS</i>	74
1. 4. 4. 1.	<i>La trombospondina de tipo 1 (TSP-1)</i>	74
1. 4. 5.	<i>FISIOPATOLOGÍA DE LA ANGIOGÉNESIS</i>	77

1. 4. 6.	<i>CAMBIOS DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA ENDOMETRIOSIS</i>	78
1. 5.	<u>INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS METALOPROTEASAS CON LA ANGIOGÉNESIS</u>	80
2.-	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	85
	<i>Hipótesis</i>	87
	<i>Objetivos</i>	88
3.-	MATERIAL Y MÉTODOS	91
3. 1.	<u>GRUPOS CLÍNICOS</u>	93
3. 2.	<u>MUESTRAS</u>	95
3. 2. 1.	<i>MUESTRAS DE SANGRE</i>	95
3. 2. 2.	<i>MUESTRAS DE TEJIDO ENDOMETRIAL Y ENDOMETRIÓSCO</i>	95
3. 2. 3.	<i>MUESTRAS DE LÍQUIDO PERITONEAL</i>	96
3. 2. 4.	<i>PROCESADO DE LAS MUESTRAS</i>	96
3. 3.	<u>TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</u>	98
3. 3. 1.	<i>EXTRACCIÓN DEL RNA</i>	98
3. 3. 2.	<i>TRATAMIENTO CON DNasa</i>	99
3. 3. 3.	<i>RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)</i>	100
3. 3. 4.	<i>PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL</i>	101
	<i>Seguimiento de la PCR en tiempo real</i>	102
	<i>Cuantificación relativa a un gen “housekeeping” con estándares externos</i>	106
	<i>Preparación de los estándares de cDNA</i>	107
	<i>Condiciones de reacción</i>	108
	<i>Controles usados en la real-time RT-PCR</i>	110
	<i>Diseño de cebadores para la amplificación por PCR</i>	110

3. 4.	<u>TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</u>	112
3. 4. 1.	<i>EXTRACCIÓN PROTEICA</i>	112
3. 4. 2.	<i>CUANTIFICACIÓN PROTEICA</i>	112
3. 4. 2. 1.	<i>Cuantificación de proteínas totales</i>	112
3. 4. 2. 2.	<i>Cuantificación proteica mediante ELISAs</i>	113
	<i>Detección de Antígenos solubles mediante ELISA de tipo Sándwich</i>	113
	<i>Técnica de ELISA para la cuantificación del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en extractos tisulares y líquido peritoneal</i>	115
	<i>Técnica de ELISA para la cuantificación del PAI-1 en sobrenadantes de cultivos de células endometriales</i>	116
	<i>Técnica de ELISA para la cuantificación del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales</i>	116
	<i>Técnica de ELISA para la cuantificación de la metaloproteasa tipo 3 (MMP-3) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales</i>	117
	<i>Técnica de ELISA para la cuantificación del inhibidor tipo 1 de las metaloproteasas (TIMP-1) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales</i>	117
	<i>Técnica de ELISA para la cuantificación del factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo A (VEGF-A) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales</i>	117
	<i>Técnica de ELISA para la cuantificación del factor de crecimiento placentario (PIGF) en extractos tisulares y líquido peritoneal</i>	117
	<i>Técnica de ELISA indirecto para la cuantificación de la trombospondina de tipo 1 (TSP-1) en extractos tisulares y sobrenadantes de cultivos de células endometriales.</i>	118
3. 5.	<u>TÉCNICAS MOLECULARES USADAS EN LA DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS</u>	119
3. 5. 1.	<i>EXTRACCIÓN DE DNA</i>	119
3. 5. 2.	<i>TÉCNICAS DE GENOTIPADO UTILIZADAS</i>	121
3. 5. 2. 1.	<i>Determinación del polimorfismo -675 4G/5G del gen del PAI-1 (rs1799768) mediante PCR específica de alelo</i>	121

3. 5. 2. 2.	<i>Determinación de los polimorfismos -1612 5A/6A (rs3025058) del gen de la MMP-3 y -460C/T (rs833061), +405C/G (rs2010963) y 936C/T (rs3025039) del gen del VEGF mediante PCR-RFLP</i>	126
3. 6.	<u>CULTIVO DE CÉLULAS ENDOMETRIALES</u>	130
3. 7.	<u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	132
4.-	RESULTADOS	135
4. 1.	<u>EXTRACTOS TISULARES</u>	138
4. 1. 1.	<i>ENDOMETRIO EUTÓPICO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS FRENTE A ENDOMETRIO CONTROL</i>	138
4. 1. 2.	<i>ENDOMETRIOMA OVÁRICO EN ESTADIOS III-IV FRENTE A ENDOMETRIO EUTÓPICO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS</i>	144
4. 1. 3.	<i>ENDOMETRIO EUTÓPICO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS EN ESTADIOS III-IV FRENTE A ESTADIOS I-II Y ENDOMETRIOMA OVÁRICO (ESTADIOS III-IV) FRENTE A IMPLANTE PERITONEAL (ESTADIOS I-II)</i>	148
4. 1. 4.	<i>EXTRACTOS TISULARES A LO LARGO DEL CICLO MENSTRUAL</i>	149
	<i> Endometrio de mujeres control</i>	149
	<i> Endometrio eutópico de mujeres con endometriosis</i>	150
	<i> Endometrioma ovárico de mujeres con endometriosis</i>	150
4. 1. 5.	<i>CORRELACIÓN ENTRE COMPONENTES DE LA ANGIOGÉNESIS Y DE LOS SISTEMAS FIBRINOLÍTICO Y DE LAS MMPS</i>	150
4. 2.	<u>LÍQUIDO PERITONEAL</u>	152
4. 3.	<u>FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS EN MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS. RELACIÓN CON LOS NIVELES DE LOS COMPONENTES ESTUDIADOS EN TEJIDO Y LÍQUIDO PERITONEAL</u>	154
4. 3. 1.	<i>POLIMORFISMO -675 4G/5G DEL GEN DEL PAI-1 (rs1799768)</i>	154
	<i> Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1</i>	154
	<i> Niveles de PAI-1 en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis según el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1</i>	155
	<i> Niveles de PAI-1 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis según el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1</i>	159

4. 3. 2.	POLIMORFISMO -1612 5A/6A DEL GEN DE LA MMP-3 (rs3025058)	161
	<i>Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 5A/6^a de la MMP-3</i>	161
	<i>Niveles de MMP-3 en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis de acuerdo con el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3</i>	162
	<i>Niveles de MMP-3 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis de acuerdo con el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3</i>	164
4. 3. 3.	POLIMORFISMOS -460C/T (rs833061), +405G/C (rs2010963) Y 936C/T (rs3025039) DEL GEN DEL VEGF-A	166
	<i>Frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos del VEGF-A</i>	166
	<i>Niveles de VEGF-A en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis según los polimorfismos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A</i>	170
	<i>Niveles de VEGF-A en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis según los polimorfismos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A</i>	174
4. 4.	<u>CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES</u>	177
4. 4. 1.	EXPERIMENTOS PREVIOS PARA OPTIMIZAR LA CONCENTRACIÓN DE LÍQUIDO PERITONEAL UTILIZADO EN LOS CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES	177
4. 4. 2.	EFECTO DEL LÍQUIDO PERITONEAL SOBRE LOS NIVELES DE uPA, MMP-3 Y VEGF-A, EN CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES DE MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS	179
4. 4. 3.	EFECTO DEL LÍQUIDO PERITONEAL SOBRE LOS NIVELES DE PAI-1, TIMP-1 Y TSP-1, EN CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES DE MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS	182
4. 4. 4.	CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS TRAS EL TRATAMIENTO CON LÍQUIDO PERITONEAL	185
5.-	DISCUSIÓN	187
	<i>Los sistemas fibrinolítico y de las MMPs en la endometriosis</i>	189
	<i>Angiogénesis y endometriosis, su relación con los sistemas fibrinolítico y de las MMPs</i>	192
	<i>Polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y la endometriosis</i>	196
	<i>Polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 y la endometriosis</i>	198

<i>Polimorfismos del gen del VEGF-A y endometriosis</i>	200
<i>Influencia del líquido peritoneal en la expresión de factores angiogénicos y proteolíticos en cultivos de células endometriales</i>	203
6.- CONCLUSIONES	207
7.- BIBLIOGRAFÍA	211
8.- APÉNDICE: TRABAJOS PUBLICADOS EN LOS QUE HA INTERVENIDO EL DOCTORANDO	253

ÍNDICE DE FIGURAS

1.- INTRODUCCIÓN

1. 1.	<i>Teorías fisiopatológicas de la endometriosis.</i>	8
1. 2.	<i>Proceso de menstruación retrógrada.</i>	10
1. 3.	<i>Localización de la endometriosis.</i>	12
1. 4.	<i>Clasificación revisada de la American Fertility Society (AFSr) para la endometriosis.</i>	13
1. 5.	<i>Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico.</i>	14
1. 6.	<i>Modelo de unión de uPA a su receptor (uPAR).</i>	20
1. 7.	<i>Modelo estructural de la conformación de la molécula de PAI-1 en estado latente.</i>	27
1. 8.	<i>Modulación de la tasa de transcripción del gen PAI-1 de acuerdo con el polimorfismo -675 4G/5G.</i>	29
1. 9.	<i>Mecanismo de regeneración peritoneal.</i>	37
1. 10.	<i>Estructura de colágeno humano.</i>	40
1. 11.	<i>Estructura de las metaloproteasas humanas.</i>	45
1. 12.	<i>Activación de las MMPs.</i>	50
1. 13.	<i>Regulación paracrina de las MMPs en el endometrio.</i>	51
1. 14.	<i>Cambios cíclicos en las MMPs en el endometrio humano.</i>	58
1. 15.	<i>Fisiopatología de la endometriosis: líquido peritoneal y MMPs.</i>	65
1. 16.	<i>Esquema de las distintas isoformas del VEGF-A generadas por splicing alternativo de los exones 6 y 7.</i>	69
1. 17.	<i>Interrelación entre el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas matriciales (MMPs).</i>	81

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1.	<i>Seguimiento de la reacción de PCR en el software del LightCycler.</i>	104
3. 2.	<i>Análisis de la curva de desnaturalización.</i>	105
3. 3.	<i>Recta estándar obtenida automáticamente, por regresión lineal, con el software del LightCycler.</i>	107
3. 4.	<i>Esquema general de un ELISA tipo sándwich.</i>	114
3. 5.	<i>Posición de los cebadores en el promotor del gen del PAI-1.</i>	123
3. 6.	<i>lectroforesis del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, mediante la técnica de PCR específica de alelo.</i>	123
3. 7.	<i>Esquema (no a escala) de la localización de los polimorfismos estudiados en el gen del VEGF.</i>	128
3. 8.	<i>Electroforesis de los polimorfismos -460C/T, +405C/G y 936C/T del gen del VEGF, mediante la técnica de PCR-RFLP.</i>	128

4.- RESULTADOS

4. 1. a.	<i>Niveles de mRNA y proteicos de uPA, MMP-3 y VEGF-A en endometrio eutópico y ectópico (muestras pareadas) de mujeres con endometriosis.</i>	146
4. 1. b.	<i>Niveles de mRNA y proteicos de PAI-1, TIMP-1 y TSP-1 en endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis.</i>	147
4. 2.	<i>Correlación entre los niveles proteicos de VEGF-A frente a los de uPA, en extracto de tejido endometrial de mujeres control.</i>	151
4. 3. a.	<i>Niveles de PAI-1 (mRNA y proteína) en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis (control).</i>	156
4. 3. b.	<i>Niveles de mRNA y proteicos de PAI-1 en tejido endometrial, de acuerdo con el genotipo del polimorfismo 4G/5G del promotor del gen PAI-1, en mujeres con y sin endometriosis.</i>	158
4. 3. c.	<i>Niveles de mRNA y proteicos de PAI-1 en tejido endometrial, de acuerdo con la presencia (4G+) o ausencia (4G-) del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del promotor del gen PAI-1, en mujeres con y sin endometriosis.</i>	159
4. 4.	<i>Niveles proteicos de PAI-1 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis.</i>	160
4. 5. a.	<i>Niveles de mRNA y proteicos de MMP-3 en tejido endometrial en mujeres con y sin endometriosis.</i>	162
4. 5. b.	<i>Niveles de mRNA y proteicos de MMP-3 en tejido endometrial, de acuerdo con el genotipo del polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3, de mujeres con y sin endometriosis.</i>	163
4. 6.	<i>Niveles proteicos de MMP-3 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis.</i>	165
4. 7.	<i>Diagrama de desequilibrio de ligamiento de los tres polimorfismos estudiados en el gen del VEGF-A.</i>	169
4. 8. a.	<i>Niveles proteicos y de mRNA de VEGF-A en tejido endometrial en mujeres con y sin endometriosis.</i>	170
4. 8. b.	<i>Niveles de mRNA de VEGF-A en tejido endometrial de acuerdo con los genotipos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A.</i>	171
4. 8. c.	<i>Niveles proteicos de VEGF-A en tejido endometrial de acuerdo con los genotipos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A.</i>	172
4. 9. a.	<i>Niveles proteicos VEGF-A en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis (control).</i>	174
4. 9. b.	<i>Niveles proteicos VEGF-A en líquido peritoneal de acuerdo con los genotipos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A.</i>	175
4. 10.	<i>Niveles proteicos de uPA y VEGF-A, obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivos de células endometriales de mujeres con endometriosis, tratados con LPE.</i>	178

4. 11. a.	<i>Niveles de mRNA de los activadores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (uPA y MMP-3) y de la angiogénesis (VEGF-A), en cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE.</i>	180
4. 11. b.	<i>Niveles proteicos de los activadores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (uPA y MMP-3) y de la angiogénesis (VEGF-A), en sobrenadantes de cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE.</i>	181
4. 12. a.	<i>Niveles de mRNA de los inhibidores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (PAI-1 y TIMP-1) y de la angiogénesis (TSP-1), en cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE.</i>	183
4. 12. b.	<i>Niveles proteicos de los activadores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (PAI-1 y TIMP-1) y de la angiogénesis (TSP-1), en sobrenadantes de cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE.</i>	184
4. 13.	<i>Correlación entre el porcentaje de cambio en los niveles de mRNA y proteína de VEGF-A frente a uPA, en cultivos endometriales de mujeres sin endometriosis tras el tratamiento con líquido peritoneal (25%), comparado con el cultivo sin líquido peritoneal.</i>	185

ÍNDICE DE TABLAS

1.-	<u>INTRODUCCIÓN</u>	
1. 1.	<i>Clasificación de los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs).</i>	56
3.-	<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	
3. 1.	<i>Resumen del número de muestras procesadas.</i>	97
3. 2.	<i>Características de los cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica.</i>	111
3. 3.	<i>Características de los cebadores utilizados para la determinación de los polimorfismos estudiados.</i>	124
3. 4.	<i>Mezclas de las reacciones de PCR y Condiciones utilizadas.</i>	125
3. 5.	<i>Características de las ERs usadas en la PCR-RFLP, condiciones de la digestión y características de los productos de la digestión.</i>	129
4.-	<u>RESULTADOS</u>	
4. 1.	<i>Niveles de componentes de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles).</i>	139
4. 2.	<i>Niveles de componentes de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles), según la fase del ciclo menstrual.</i>	140
4. 3.	<i>Niveles de componentes de la angiogénesis en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles).</i>	142
4. 4.	<i>Niveles de los componentes de la angiogénesis en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles), por fase del ciclo menstrual.</i>	143
4. 5.	<i>Niveles de componentes de los sistemas fibrinolítico, de las MMPs y de la angiogénesis en extractos tisulares de lesiones endometriósicas, según el estadio de la enfermedad.</i>	149
4. 6.	<i>Niveles proteicos de diversos componentes de los sistemas fibrinolítico, de las MMPs y de la angiogénesis, en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis (controles).</i>	152
4. 7.	<i>Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 en mujeres con y sin endometriosis.</i>	155
4. 8.	<i>Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 en mujeres con y sin endometriosis.</i>	161
4. 9.	<i>Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo -460C/T del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis.</i>	166
4. 10.	<i>Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo +405G/C del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis.</i>	167

4. 11.	<i>Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 936C/T del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis.</i>	168
4. 12.	<i>Frecuencia haplotípica del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis.</i>	169
4. 13.	<i>Niveles de VEGF-A de acuerdo con los polimorfismos del gen del VEGF-A en endometrio de mujeres con y sin endometriosis.</i>	173
4. 14.	<i>Niveles de VEGF-A de acuerdo con los polimorfismos del gen del VEGF-A en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis.</i>	176

1.- INTRODUCCIÓN

“Disculpen si les llamo caballeros, pero es que no les conozco muy bien.”

Groucho Marx

1. 1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es una enfermedad de la mujer que se define como la presencia de tejido idéntico al endometrio uterino en lugares diferentes al fisiológico [1, 2]. La importancia del estudio de esta patología radica en su alta prevalencia, ya que afecta a casi al 10% de las mujeres en edad fértil y hasta al 30% de mujeres con esterilidad [1]. Las mujeres con endometriosis presentan con frecuencia clínica de dolor, que puede expresarse como dismenorrea (menstruación dolorosa), dispareunia (relaciones sexuales dolorosas), y dolor pélvico crónico [3]. Se ha establecido que es una de las enfermedades más invalidantes que puede sufrir una mujer cíclicamente a lo largo de su vida reproductiva ya que se produce con frecuencia una alteración de la anatomía genital que puede comprometer su función y explicar la sintomatología dolorosa acompañante. Todo ello, unido a las consecuencias nocivas sobre la fertilidad [2, 4, 5], da idea de la importancia del estudio fisiopatológico de dicha enfermedad para poder incidir en su tratamiento precoz e incluso en su prevención.

La endometriosis lleva estudiándose durante varias décadas pero, a pesar del largo tiempo transcurrido, su etiología y patogenia no se conocen claramente. En 1927, Sampson describió la teoría de la menstruación retrógrada e implantación de células de endometrio viable [6]. Sin embargo, las incógnitas acerca de los mecanismos íntimos que explican la implantación del endometrio en regiones ectópicas siguen sin resolverse. Se han sugerido diversos factores como causa de endometriosis, incluyendo alteraciones del sistema inmunológico, proteolítico, de la angiogénesis, del ambiente peritoneal, del propio tejido endometrial y una predisposición genética [7-12]. Esta patogenia multifactorial, unida a su heterogeneidad clínica, ha facilitado la diversidad de corrientes para explicar su etiología y la ausencia de uniformidad de criterio en el mecanismo íntimo de la génesis de la endometriosis.

Aunque la endometriosis es una enfermedad benigna, el tejido endometrial, después de adherirse al peritoneo, tiene la propiedad de proliferar de forma similar al tejido tumoral [13]. Al igual que ocurre en la invasión tumoral, tiene lugar una proteólisis

local extracelular que produce una degradación de la MEC del peritoneo o del ovario, lo que determina la implantación del tejido endometrial en localizaciones ectópicas [14].

Paralelamente, el desarrollo de procesos de neoangiogénesis en estos lugares contribuye en la formación de la lesión endometriósica inicial.

Estudios recientes de expresión génica han indicado que el ambiente molecular del endometrio patológico es diferente al del endometrio normal [15-18]. Sin embargo, quedan muchos interrogantes por contestar en el campo de la expresión, la regulación y el significado biológico de muchos de estos genes en la fisiología y patología endometrial.

1. 1. 1. TEORIAS ETIOPATOGENICAS

Existen referencias en relación a la localización aberrante del tejido endometrial desde hace más de 300 años en diversos documentos históricos de origen europeo [19]. La primera descripción en una publicación científica data de 1690, aunque no fue hasta finales del siglo XIX cuando se describió con detalle lo que hoy entendemos por endometriosis [20, 21]. Sin embargo, fue Sampson [22] quien definió las características morfológicas y semiológicas de esta enfermedad, de forma que a partir de entonces fue considerada como entidad clínica específica. Desde entonces, son muchos los avances en la comprensión de los procesos fisiopatológicos involucrados en la génesis de la endometriosis, aunque los mecanismos íntimos de la misma continúan todavía sin conocerse completamente.

Existen dos grupos de teorías que permiten explicar el desarrollo de esta enfermedad: 1) por implantación y crecimiento del tejido endometrial tras un proceso de transporte; 2) por diferenciación o metaplasia de tejido preexistente distinto al endometrial que mantiene su capacidad de diferenciarse en tejidos diferentes bajo la influencia de ciertos estímulos. Además, hay un grupo de teorías integradoras, que intentan explicar los distintos casos de endometriosis.

1. 1. 1. a. Por implantación y crecimiento de tejido endometrial tras un proceso de transporte

La **teoría de la implantación (o de Sampson)** sugiere que la lesión endometriósica se produce como resultado del reflujo de tejido endometrial viable, a través de las trompas de Falopio, el cual se implanta en la superficie peritoneal o en órganos pélvicos, donde prolifera ectópicamente [6, 23]. La **teoría de la diseminación (o metástasis) linfática y vascular (o de Halban)** postula que los fragmentos endometriales pasan a través de los vasos linfáticos y vasculares hasta la cavidad pélvica y otras localizaciones más alejadas de la cavidad peritoneal [24].

Hay una serie de observaciones que apoyan la teoría de la implantación. 1) La endometriosis solo se produce de forma natural en primates, los únicos mamíferos que menstrúan, tal y como se ha observado en babuinos en cautividad [25, 26]. 2) La menstruación retrograda es un fenómeno casi universal en mujeres con presencia de trompas de Falopio normales [27, 28]. 3) Las células endometriales, obtenidas a partir del flujo menstrual [29, 30] y del líquido peritoneal [31], se pueden cultivar, con lo que continúan siendo viables. 4) Las células endometriales, obtenidas a partir del flujo menstrual, tienen la capacidad de implantarse y proliferar en localizaciones ectópicas *in vivo* [32, 33]. 5) Además, también tienen la capacidad de implantarse y proliferar en localizaciones ectópicas *in vitro*. [34, 35] 6) La obstrucción del flujo menstrual de forma natural [36, 37] y experimental, usando modelos de primate [38], están asociadas a la endometriosis. 7) Los implantes endometriósicos se producen con mayor frecuencia en aquellas áreas en las que se espera un estancamiento de los restos menstruales del reflujo tubárico [39, 40].

Todos estos hallazgos hacen pensar que la endometriosis se debe a la implantación de fragmentos endometriales regurgitados en la cavidad peritoneal con la menstruación retrógrada. El problema de esta teoría es que la menstruación retrógrada es un fenómeno que se produce en todas (o casi todas) las mujeres [27], y la endometriosis solo se da en un porcentaje pequeño de la población. Habitualmente existen mecanismos de depuración peritoneal que son capaces de eliminar estos fragmentos endometriales impidiendo el

desarrollo de la lesión endometriósica. La resistencia a estos mecanismos fisiológicos se intenta explicar por las diferencias, a nivel de expresión génica y proteica, entre el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis y de mujeres sin endometriosis [41], por lo que el defecto primordial de la endometriosis lo deberíamos encontrar en el endometrio eutópico.

Además, durante los últimos años se han acumulado distintas evidencias sobre alteraciones del endometrio eutópico y/o ectópico, constitutivas o adquiridas, que favorecen los procesos potencialmente implicados en este fenómeno [42]. Distintas moléculas implicadas en la apoptosis, la adhesión, el crecimiento, la angiogénesis y los mecanismos para escapar del sistema inmunológico se han visto cualitativa o cuantitativamente afectadas en endometrio eutópico o ectópico de las mujeres con endometriosis con respecto a las mujeres sin endometriosis. Estas alteraciones, que pueden afectar la actividad fisiológica del endometrio, han llevado a explicar porqué sólo algunas mujeres desarrollan la enfermedad.

En este contexto se debe tener en cuenta que la endometriosis por si misma favorece un estado de inflamación peritoneal que puede contribuir al mantenimiento de la enfermedad [43]. Así, es posible que muchas de las alteraciones moleculares encontradas en el endometrio ectópico de mujeres con endometriosis, e incluso en el endometrio eutópico, sean una consecuencia de la inflamación peritoneal más que la causa de la enfermedad. Por otro lado, algunas de las diferencias observadas entre endometrio eutópico y ectópico de las mujeres con endometriosis se pueden deber a la influencia directa del microambiente peritoneal [44-47]. En cualquier caso, una vez que el endometrio se implanta a nivel peritoneal se produciría una lesión endometriósica que será clínicamente diferente en función de su localización y el estado evolutivo de la enfermedad.

1. 1. 1. b. Por diferenciación de tejido preexistente distinto al endometrial

La **teoría de la metaplasia celómica** sugiere que un epitelio con capacidad proliferativa, como es el caso del epitelio mesotelial, que recubre los ovarios y el peritoneo, contiene células capaces de transformarse por metaplasia en tejido endometrial [48, 49]. La **teoría de la inducción** es una extensión de la teoría celómica, y propone que el epitelio mesotelial es capaz de diferenciarse dando lugar a lesiones endometriósicas tras inducirse por algún o algunos factores hormonales, bioquímicos y/o inmunológicos. La **teoría de los restos embrionarios** propone que la endometriosis se produce por estimulación de restos celulares embrionarios que se diferencian dando lugar a endometrio funcional [21, 50]. Un componente atractivo de la teoría de la metaplasia celómica y de la inducción es que justifican la aparición de endometriosis en cualquier localización en la que se encuentre mesotelio [51].

Sin embargo, existen diversos aspectos clínicos que van en contra de las teorías de la metaplasia celómica y de la inducción. Si la metaplasia celómica es similar a la metaplasia común, entonces la frecuencia de endometriosis debería incrementarse progresivamente con la edad, aspecto que no se observa en la práctica clínica. Además, la mayor frecuencia de las lesiones endometriósicas en las áreas anatómicas cercanas a las trompas o la lateralidad de la endometriosis en ciertas localizaciones serían difícilmente explicables por esta teoría.

1. 1. 1. c. Teorías integradoras

La patogénesis de la endometriosis puede ser multifactorial y una sola teoría puede que nunca explique todos los casos de la enfermedad.

En 1949, Javert [52] propuso una teoría integradora de la histogénesis de la endometriosis en la que combina las teorías de la implantación y la metástasis linfática/vascular con una teoría de extensión directa de tejido endometrial a través del miometrio. Por otro lado, en 1997, Nisolle y Donnez [53], propusieron una teoría en la que defienden que la histogénesis de la endometriosis depende de la localización y tipo de implante endometriósico. De esta forma, la endometriosis peritoneal se puede explicar

por la teoría de la implantación, los endometriomas ováricos pueden surgir como resultado de la metaplasia celómica a partir de inclusiones formadas por epitelio ovárico invaginado, y la endometriosis rectovaginal, que a menudo tiene aspecto de adenomiosis, podría ser resultado de la metaplasia de restos müllerianos localizados en el septo rectovaginal [53].

Estas teorías son atractivas al reconocer varios mecanismos de histogénesis. Parece lógico que una enfermedad con manifestaciones tan variables se pueda originar a partir de distintos mecanismos.

1. 1. 2. EVOLUCIÓN Y CONSOLIDACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS

Las lesiones peritoneales establecidas por alguno de los mecanismos citados evolucionan en su mayoría a la cicatrización [54]. Sin embargo, algunas de ellas permanecen activas desencadenando lesiones ováricas y peritoneales profundas (Figura 1. 1).

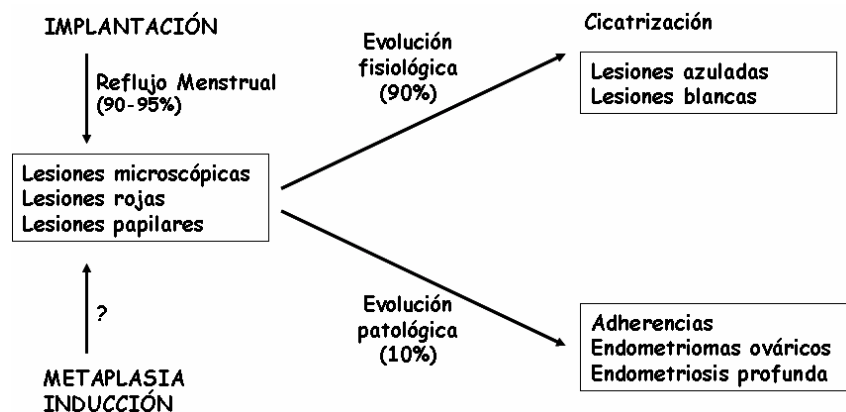


Figura 1. 1. Teorías fisiopatológicas de la endometriosis. La menstruación retrógrada es un proceso fisiológico que ocurre en la mayoría de las mujeres. La mayoría de las lesiones endometrióticas iniciales sufren un proceso de cicatrización y pierden su actividad. En algunas mujeres, estas lesiones pueden seguir un proceso diferente que desemboca en una enfermedad con manifestaciones clínicas diferentes (modificado de Belaisch y col [54]).

La progresión de la endometriosis se produce en varias etapas: 1) reflujo menstrual; 2) adhesión al peritoneo o estructuras periféricas; 3) proteolisis de la MEC del tejido invadido; 4) proliferación; 5) angiogénesis; 6) cicatrización.

Así pues, según la teoría de la implantación, el reflujo de las células endometriales a la cavidad peritoneal es una condición necesaria, pero no suficiente, para el desarrollo de la enfermedad. Aunque parece ser un factor importante, ya que las menstruaciones en mujeres con endometriosis son con frecuencia más largas y abundantes [55].

Las células endometriales expresan moléculas de adhesión (integrinas) en su superficie [56], lo que les confiere la capacidad potencial de unirse al peritoneo. Aunque las células endometriales aisladas, a diferencia de los fragmentos endometriales en los que se asocian glándulas y estroma, sólo tienen capacidad de adhesión a la MEC y no al peritoneo intacto [35, 57-59]. Además, existe una importante regulación hormonal en este proceso, la exposición del endometrio a la acción de la progesterona durante 24 horas antes de su inyección intraperitoneal en modelos de experimentación animal ha demostrado disminuir su capacidad de implantación [60].

Tras migrar a la cavidad abdominal, los fragmentos de endometrio expresan metaloproteasas (MMPs) que son capaces de degradar la membrana basal y numerosos componentes de la MEC [61]. Así pues, la exposición de la MEC del mesotelio podría ser el resultado de una actividad enzimática excesiva, evidenciada por un mayor nivel de proteasas que actuarían sobre un peritoneo previamente debilitado. Además, existen numerosos factores que pueden dañar el peritoneo (cirugía, toxinas, bacterias, células inflamatorias...), lo que explica la alta frecuencia de implantes endometriósicos microscópicos (20% de los casos de esterilidad inexplicada) en biopsias randomizadas de peritoneo aparentemente normal [62-64]. Por otro lado el endometrio produce factores angiogénicos que son esenciales para la neovascularización local [65].

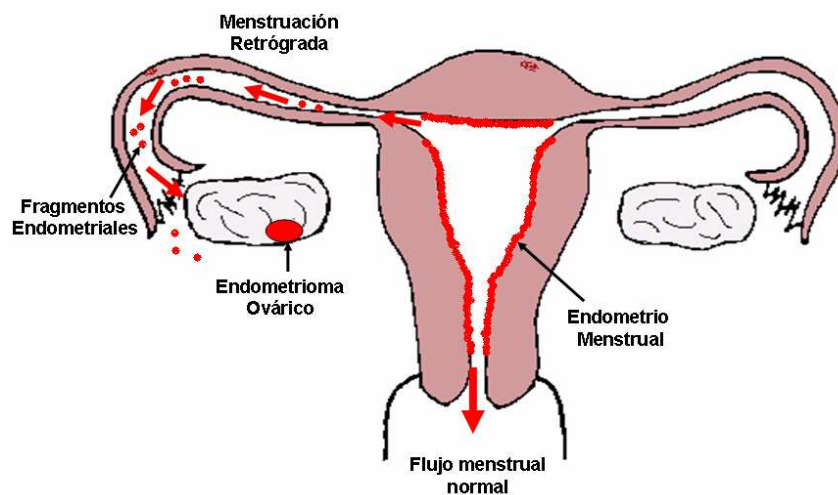


Figura 1. 2. Proceso de menstruación retrógrada. Durante la menstruación existen fragmentos de tejido endometrial que migran retrógradamente, a través de las trompas de Falopio, hasta la cavidad peritoneal. Estos fragmentos contienen numerosos factores, entre los que se incluyen citoquinas y diversos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

Existen diferentes mecanismos de protección fisiológica para interrumpir el proceso en cada etapa. De forma que el ambiente peritoneal, en la mayoría de las mujeres, es capaz de reabsorber el tejido endometrial presente al final de la menstruación.

Así pues, para que se desarrolle la endometriosis hay dos posibilidades, o bien los fragmentos endometriales son capaces de resistir los mecanismos normales de depuración peritoneal [54], o hay una alteración de los componentes celulares y/o humorales del líquido peritoneal, lo que ocasiona una depuración deficiente.

Esta segunda posibilidad podría ser consecuencia de anomalías en algunos de los factores presentes en el ambiente peritoneal como pueden ser los macrófagos y las células NK (“*Natural Killer*”), citoquinas, factores de crecimiento y hormonas locales, o bien el propio mesotelio peritoneal, que puede estar dañado.

Los macrófagos constituyen el 85% de las células del líquido peritoneal [66]. Su número y nivel de activación varía a lo largo del ciclo menstrual, con un máximo en el periodo postmenstrual con el fin de eliminar de la cavidad peritoneal los restos endometriales, espermatozoides y células foliculares. En las mujeres con endometriosis el

número de macrófagos está aumentado [66] y además tienen un mayor nivel de activación [67, 68]. Por otro lado, las células NK del líquido peritoneal participan en la purificación de la cavidad peritoneal gracias a su actividad citotóxica sobre células extrañas [69, 70]. Además, la actividad citotóxica de las células NK circulantes y peritoneales está reducida en mujeres con endometriosis, a pesar de que el número de las mismas es normal [71, 72].

Por otra parte, la presencia de alteraciones anatómicas podría empeorar la capacidad de depurado peritoneal o contribuir a aumentar el reflujo menstrual. Dentro de estos factores anómalos del ambiente peritoneal se han citado la hipertonia de la unión uterotubular [73], el desarrollo de ondas contráctiles retrógradas en la musculatura tubular y miometrial [74] y la presencia de malformaciones uterinas que dificultan la menstruación anterógrada normal [36].

1. 1. 3. EPIDEMIOLOGÍA

La endometriosis es una enfermedad ginecológica bastante común, crónica, benigna y dependiente de estrógenos, que está asociada a dolor pélvico y esterilidad. Se caracteriza por la presencia de tejido endometrial uterino fuera de su localización normal, principalmente en el peritoneo pélvico, pero también en los ovarios y en el septo rectovaginal, y raramente en otras localizaciones como el pericardio, la pleura e incluso el cerebro. La prevalencia de la endometriosis pélvica está en torno al 8-10% en la población general femenina y en torno al 35-50% en mujeres con dolor y/o esterilidad [75].

Los factores de riesgo de la endometriosis incluyen la edad de la mujer, factores menstruales y reproductivos, historia familiar, hábitos de vida, índice de masa corporal y factores ambientales [76-78].

En relación a la historia familiar, la existencia de familiares de primer grado afectados aumenta el riesgo [79, 80], fundamentalmente en gemelas monozigóticas [81, 82]. Estos resultados deben tomarse con cautela, ya que no se puede excluir que la

información esté sesgada. En los casos de endometriosis se puede tender a realizar una historia familiar más exacta que en controles [77].

La endometriosis es una enfermedad compleja, ya que las localizaciones ectópicas pueden ser múltiples y de aspecto variable. La localización habitual de la endometriosis es la pelvis, en especial los ovarios y las áreas cercanas que están cubiertas por peritoneo, como es el caso del fondo de saco de Douglas, el ligamento ancho y los ligamentos uterosacros (Figura 1. 3). También se ha observado la presencia de implantes endometriósicos a distancia. Debido a la complejidad de la enfermedad, se necesita un sistema de clasificación simple y descriptivo que permita comparar los resultados entre los diferentes estudios.

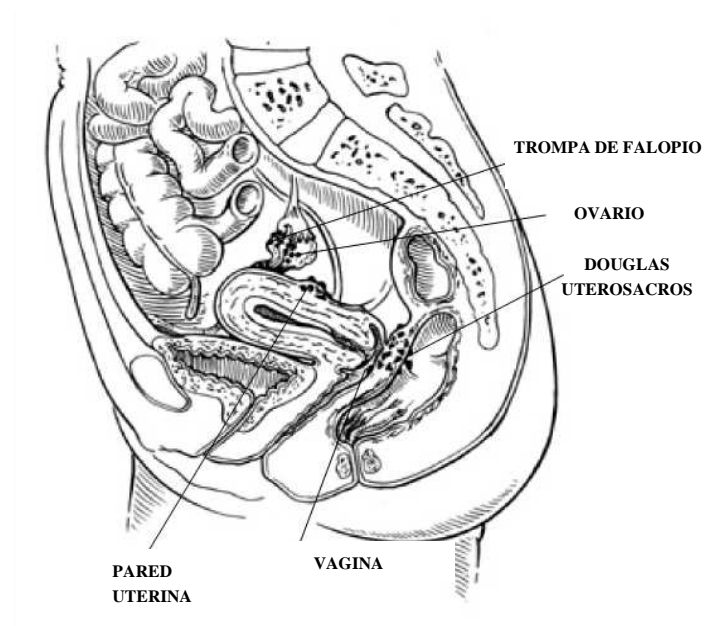


Figura 1. 3. Localización de la endometriosis. La endometriosis se localiza en las regiones cercanas a las fimbrias de ambas trompas de Falopio, situación clínica que refuerza la teoría de la menstruación retrógrada como factor determinante en la patogenia de la enfermedad (<http://www.healthsquare.com/fgwh/wh1c0801.jpg>).

1. 1. 4. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS

El sistema de clasificación más utilizado es la clasificación revisada de la *American Fertility Society (AFSr)*. Se basa en la descripción de la localización y la extensión de las lesiones evidenciadas durante el examen laparoscópico o laparotómico [83]. Propone una exhaustiva clasificación en estadios según un sistema de puntuación: estadio I, endometriosis mínima (1 a 5 puntos); estadio II, leve (6 a 15 puntos); estadio III, moderada (16 a 40 puntos); estadio IV, severa (más de 40 puntos) (Figura 1. 4).

Esta clasificación topográfica es muy útil para establecer la extensión de la enfermedad y clasifica correctamente la endometriosis ovárica y peritoneal, sin embargo es de menor utilidad para la valoración de otras localizaciones, como la rectovaginal o extragenital, y no hace referencia a la funcionalidad de los órganos reproductivos.

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

Nombre de la paciente _____ Fecha _____

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

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

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

Endometriosis adicional: _____ Patología acompañante: _____

Para emplearse con las trompas y los ovarios normales

Para emplearse con trompas, ovarios o ambos anormales

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

1. 2. ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA FIBRINOLÍTICO

1. 2. 1. ASPECTOS GENERALES DE LA FIBRINOLISIS

La fibrinólisis, término introducido por Dastre a finales del S. XIX [84], se define como el conjunto de mecanismos encargados de disolver el coágulo de fibrina. El funcionamiento del sistema fibrinolítico tiene como base la conversión de un proenzima, el plasminógeno, en su enzima proteolíticamente activo, la plasmina, capaz de eliminar el coágulo al degradar la fibrina [85, 86] (Figura 1. 5). Cuando la plasmina actúa sobre la fibrina genera productos de degradación de la fibrina, exponiendo en la fibrina residuos de lisina en posición carboxiterminal. Estos residuos constituyen sitios de unión para el tPA y el plasminógeno, siendo responsables de amplificar enormemente la cascada de la fibrinólisis.

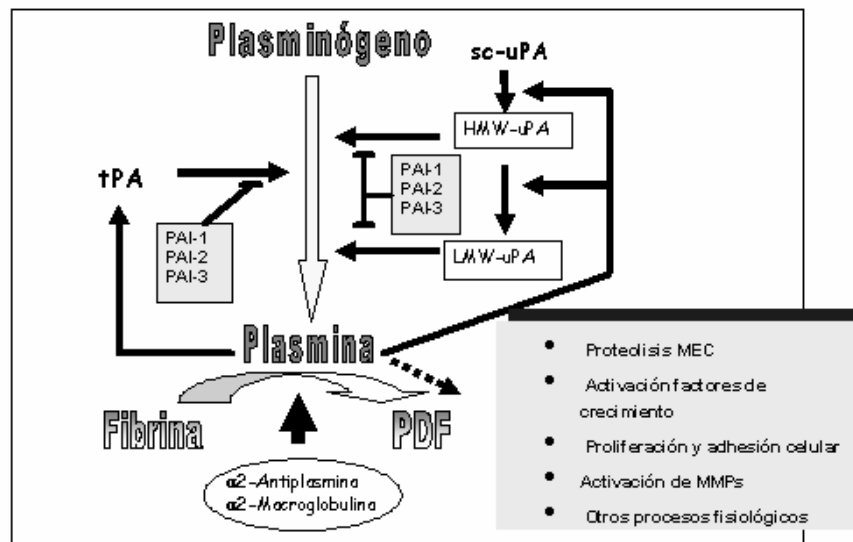


Figura 1. 5. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico. tPA: Activador tisular del plasminógeno; uPA activador del plasminógeno tipo uroquinasa; sc-uPA: uPA de una cadena; HMW-uPA: uPA de elevada masa molecular; LMW-uPA: uPA de baja masa molecular; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; PDF: Productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno.

Además de su función fibrinolítica en el plasma, la plasmina tiene una importante función proteolítica a nivel tisular, actuando directamente sobre glicoproteínas de la MEC e indirectamente al activar las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) y degradar los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs). Además, también está implicada en los procesos de proliferación y migración celular.

La plasmina también interviene en procesos fisiológicos como la menstruación, la ovulación y la implantación embrionaria [87-89] y en situaciones patológicas como el cáncer [90-93] o la endometriosis [8, 14, 94, 95].

La transformación del plasminógeno en plasmina se produce mediante la acción proteolítica de dos enzimas, denominados activador tisular del plasminógeno (tPA) y activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA).

Como en cualquier proceso biológico regulado, a esta tendencia profibrinolítica se opone una actividad antifibrinolítica mediada por inhibidores de los enzimas proteolíticos a varios niveles. Por un lado están los inhibidores que impiden la activación del plasminógeno a plasmina (PAIs, que inhiben a los activadores del plasminógeno tPA y uPA) y por otro lado están los inhibidores directos de la plasmina, la α_2 -antiplasmina (su principal inhibidor fisiológico) y la α_2 -macroglobulina. Además, hay otro mecanismo que regula negativamente dicha activación, la vía del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (*Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*, TAFI) [96]. Se sabe que los residuos de aminoácidos básicos (lisina y arginina) exhibidos en la superficie de la fibrina parcialmente degradada sirven de anclaje al plasminógeno y al tPA [96]. Cuando el plasminógeno y el tPA coinciden en la superficie del coágulo de fibrina tiene lugar la activación del plasminógeno en plasmina. Pues bien, precisamente a ese nivel, el TAFI una vez activado (TAFIa) es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina, lo cual reduce drásticamente la activación del plasminógeno en plasmina, disminuyendo la fibrinólisis [96].

Todos estos factores son determinantes en el proceso de fibrinólisis, de forma que una correcta hemostasia dependerá de un equilibrio adecuado entre todas estas fuerzas opuestas [85]. Por otra parte, el equilibrio entre ellas se encuentra íntimamente relacionado con la

hemostasia primaria (dependiente de las plaquetas) y con la hemostasia secundaria (dependiente de la coagulación). Por último, interesa resaltar que no se trata de un equilibrio estático, sino tremendamente dinámico y adaptable a diferentes situaciones fisiológicas.

Antes de profundizar en la importancia del sistema fibrinolítico en la endometriosis es conveniente describir la naturaleza de sus componentes y las interrelaciones que se dan entre ellos a nivel molecular.

1. 2. 2. PLASMINÓGENO Y PLASMINA

El gen del plasminógeno se localiza en la posición 6q26 [97] y se extiende a lo largo de 52,5 kilobases, fragmentado en 19 exones [98]. Además, este gen está estrechamente relacionado con el gen que codifica la apolipoproteína (a) [99].

El plasminógeno es una glicoproteína sintetizada fundamentalmente en el hígado, aunque también se han descrito otros lugares de síntesis como los eosinófilos o las células renales. Los niveles de plasminógeno en el plasma son relativamente constantes (200 mg/l) y no varían excesivamente con la edad ni con el sexo.

El plasminógeno está formado por una cadena polipeptídica de 791 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 92 kDa. Contiene 5 regiones homólogas de triple lazo o *kringles* [100], las cuales contienen unas estructuras llamadas sitios de unión a lisina (LBS, “lysine binding sites”) que son responsables de la unión plasminógeno:fibrina y de la interacción plasmina: α_2 -antiplasmina, jugando de este modo un papel crucial en la regulación de la fibrinólisis [101, 102]. Cada uno de estos *kringles* está codificado por dos exones.

El zimógeno nativo posee un residuo de ácido glutámico en posición amino-terminal (Glu-plasminógeno). La activación del Glu-plasminógeno en el plasma humano tiene lugar mediante el corte del enlace Arg561-Val562 [103].

La plasmina es la forma enzimáticamente activa del plasminógeno. Es una serín-proteasa de doble cadena del tipo de la tripsina, que está formada por dos cadenas

polipeptídicas unidas entre sí por dos puentes disulfuro [104]. Atendiendo a su masa molecular, se denomina cadena pesada a la que deriva de la porción amino-terminal del plasminógeno, y cadena ligera a la que deriva de la porción carboxi-terminal. La cadena pesada contiene un péptido de activación y los 5 *kringles* descritos en el plasminógeno, en los cuales se encuentran los lugares de unión a la lisina (LBS). La cadena ligera contiene el centro activo con la configuración típica de las serín-proteasas.

La plasmina tiene como sustratos más específicos la fibrina y el fibrinógeno [105], dando lugar a los llamados productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina (PDF/pdf). Pero la plasmina no solo ejerce su acción proteolítica (fibrinolítica) a nivel plasmático. También actúa a nivel tisular tanto directamente, degradando diversas glicoproteínas de la membrana basal y de la MEC (contribuyendo al remodelado tisular y favoreciendo el acceso de otras proteasas), como indirectamente, por un lado activando proteolíticamente a las MMPs y, así, regulando sus niveles y, por otro lado degradando proteolíticamente a los TIMPs. Estas MMPs son capaces de degradar los distintos componentes resistentes a la plasmina, como el colágeno (Figura 1. 6) [106, 107]. Además, la plasmina también regula la activación proteolítica de factores de crecimiento, estando implicada en la proliferación celular.

También, a través de los LBS, el plasminógeno y la plasmina son capaces de interactuar con los receptores del plasminógeno que existen en la superficie de la célula endotelial y de otras células [108]. Estos receptores modulan el proceso de fibrinólisis y, en particular, los procesos proteolíticos relacionados con la migración celular que tienen lugar en la superficie celular.

La inhibición de la plasmina por la α_2 -antiplasmina tiene lugar a través de los LBS y por el centro activo. Por ello, cuando la plasmina está unida a la fibrina, con los LBS bloqueados, no se inactiva y actúa como un eficaz fibrinolítico.

1. 2. 3. ACTIVADORES FIBRINOLÍTICOS

Los activadores fisiológicos del plasminógeno, el tPA y la uPA, representan el papel dual del sistema fibrinolítico, ya que mientras que la activación del tPA es importante para el proceso de fibrinólisis, la uPA modula el proceso proteolítico pericelular de la MEC. Así, a pesar de que ambos activadores poseen actividades enzimáticas comunes, parecen desempeñar distintos papeles en el organismo.

El tPA es una serín-proteasa que se sintetiza fundamentalmente en las células endoteliales y está presente en el plasma a bajas concentraciones, pudiéndose detectar niveles antigénicos de tPA circulante del orden de 5 ng/ml. En su mayor parte se puede encontrar formando complejos con el PAI-1 y alrededor del 5% se puede detectar en forma libre y activa en el plasma.

Una de las características más interesantes del sc-tPA es su baja actividad enzimática en un sistema purificado. Sin embargo, la eficacia catalítica de la conversión del plasminógeno a plasmina se incrementa unas 1.500 veces en presencia de fibrina o de fragmentos de ésta [109]. Esto se debe a que la fibrina actúa como superficie sobre la cual se unen secuencialmente el tPA y el plasminógeno para formar un complejo ternario. La gran afinidad del tPA por el plasminógeno en presencia de fibrina da como resultado una eficiente activación del plasminógeno a plasmina en la zona del coágulo, mientras que al mismo tiempo la activación en el plasma circulante permanece muy reducida. Así pues, la principal función del tPA parece estar asociada con la fibrinólisis a nivel endotelial, siendo su actividad proteolítica tisular de menor importancia que la de la uPA. No se han observado diferencias significativas en las actividades de ambas formas en presencia de fibrina [110].

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

El gen de la uPA humana está localizado en la banda cromosómica 10q24 [111] y contiene 11 exones a lo largo de 6,4 Kb [112]. La uPA es una serín-proteasa de tipo tripsina, aislada inicialmente de la orina humana en forma de doble cadena (tc-uPA). Sin embargo, y como en el caso del tPA, la uPA se sintetiza inicialmente como una molécula de una sola

cadena polipeptídica (sc-uPA) [113] compuesta por 411 aminoácidos y con una masa molecular de 54 KDa.

Tras digestión parcial por parte de la plasmina o la calicreína, a nivel del enlace peptídico Lys158-Ile159, la sc-uPA se convierte en la forma de doble cadena tc-uPA, denominada también uroquinasa de elevada masa molecular (HMW-uPA), formada por una cadena ligera A, que representa el extremo N-terminal del sc-uPA y que contiene 158 aminoácidos, y una cadena pesada B con 253 aminoácidos. En esta última se localiza el centro catalítico formado por la triada catalítica His204, Asp255 y Ser356, de tal modo que el puente disulfuro Cys194-Cys222 es esencial para mantener la actividad del enzima. Por su parte, la cadena ligera contiene una región homóloga al factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano (residuos 9-45), y una región *kringle* (aminoácidos 45-134). La HMW-uPA puede ser escindida por la plasmina en una forma de uroquinasa de baja masa molecular (33 KDa) y enzimáticamente activa (LMW-uPA) y una molécula que no es enzimáticamente activa denominada ATF-uPA, que mantiene la capacidad de unirse al receptor de la uPA [114].

La concentración de sc-uPA en plasma es de 8 a 10 ng/ml y su vida media es de 5 a 8 minutos, siendo predominantemente metabolizada en el hígado.

Cuando se incuba sc-uPA con plasminógeno, en un sistema purificado, se genera rápidamente tanto tc-uPA como plasmina. El análisis cinético de este proceso revela que se trata en realidad de una secuencia de tres reacciones [115, 116]. En la primera, el sc-uPA actúa directamente sobre el plasminógeno generando pequeñas cantidades de plasmina. A continuación, la plasmina convierte el sc-uPA en tc-uPA, y ésta dirige finalmente la activación del plasminógeno.

A nivel celular, la uPA se une específicamente a su receptor (uPAR) expresado en diferentes tipos celulares [117]. Este receptor de superficie está formado por 283 aminoácidos que se anclan en la membrana por una cola glicosil fosfatidil inositol (GPI) [118, 119]. Este receptor de superficie parece jugar un papel central en la regulación de la proteólisis extracelular. Se han descrito variantes solubles del uPAR, denominadas suPAR,

las cuales se producen bien por splicing alternativo del mismo gen [120] o por eliminación de la cola GPI de la isoforma completa [121]. (Figura 1. 6).

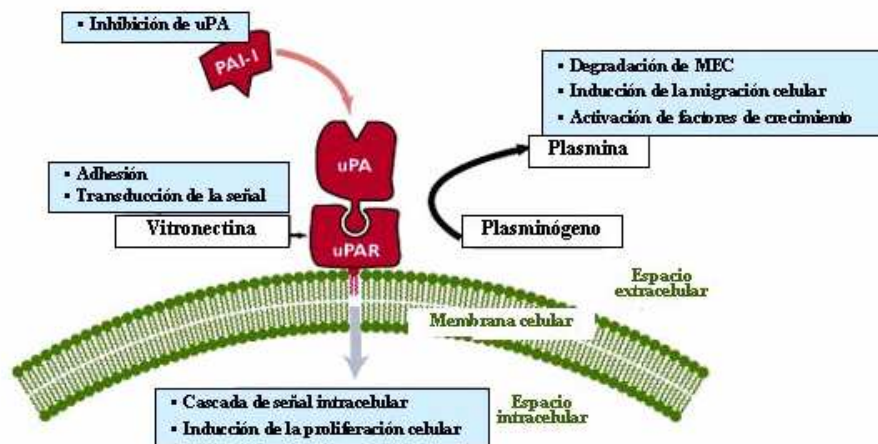


Figura 1. 6. Modelo de unión de uPA a su receptor (uPAR). La molécula de uPA es secretada y se une con gran afinidad y especificidad al uPAR. Esta unión activa la uPA, limitando la actividad proteolítica en la superficie celular. Los componentes de la MEC se degradan por la plasmína, facilitando la migración celular y la angiogénesis. La vitronectina interactúa con el uPAR desencadenando una activación de la cascada de señal intracelular (modificado de http://www.wilex.de/R&D/uPA_Target.htm).

La unión de la uPA a su receptor permite la generación controlada de plasmína próxima a la superficie de las células, produciéndose proteólisis en localizaciones muy específicas. Además, la uPA también es capaz de degradar la MEC en ausencia de plasminógeno [122]. Y tanto la uPA como la plasmína pueden activar a otras familias de proteasas, como las MMPs, de forma que este conjunto de proteasas actúan degradando eficazmente los componentes de la MEC. Así pues, las células portadoras del receptor uPAR, tras la unión de su ligando podrán invadir tejidos adyacentes e incluso entrar en la circulación sanguínea, con lo que pueden alcanzar localizaciones remotas. Esta proteólisis controlada modula la capacidad de migración e invasión de estas células al regular las interacciones entre ellas mismas y entre ellas y la membrana basal o la MEC [123]. Estos mecanismos regulan la migración celular en condiciones fisiológicas y patológicas, como

es el caso de la angiogénesis, la implantación embrionaria, la reacción inflamatoria, la cicatrización cutánea y la implantación de metástasis tumorales [124-126].

También, junto a la plasmina, la uPA posee la capacidad de activar y liberar factores de crecimiento unidos a la MEC o a la superficie celular, promoviendo crecimiento celular y angiogénesis. Por otra parte, la unión de la uPA a su receptor, uPAR, también tiene un efecto mitogénico [127], por lo que estos mecanismos son importantes para el proceso de regeneración tisular.

El uPAR podría actuar también como receptor de la MEC durante el proceso de adhesión celular [128], ya que es capaz de unirse a la vitronectina y a las integrinas [129, 130]. La uPA unida a su receptor también es susceptible de inhibición por los PAIs, aunque a una menor velocidad, lo que podría jugar un papel importante en el control de la activación del plasminógeno a nivel tisular y en la proteólisis de la MEC. Se cree que el uPAR puede incrementar la disponibilidad local de uPA debido a este enlentecimiento de la inhibición por el PAI-1 y la disminución de su eliminación.

La vía de la uPA juega, en general, un papel importante en la fisiología uterina [131] y, más concretamente, en el inicio de la menstruación [132]. La expresión de uPA está regulada por mecanismos paracrinos y factores esteroideos [133, 134]. La uPA puede ser inactivada por progesterona en cultivos de células endometriales estromales debido a un aumento de la expresión de PAI-1 y de uPAR en la superficie celular [129]. Por otra parte, se ha descrito una asociación de uPA a nivel de la membrana basal de la glándula endometrial en relación con la hiperplasia y el adenocarcinoma de endometrio [135, 136] y con el cáncer de ovario [137].

Regulación de la uPA

La transcripción de un gen está regulada principalmente por la actividad de unos factores nucleares específicos que gobiernan la frecuencia de inicio de la transcripción. Esos factores interaccionan con secuencias específicas situadas, generalmente, en la región 5' de los genes, modulando la actividad de la RNA polimerasa. En cuanto a la regulación de la uPA, se ha descrito que su promotor contiene una caja TATA (secuencia prácticamente

universal en los genes eucariotas de inicio de transcripción y característica de genes regulados) y una región de unas 200 bases rica en GC (característica de los genes de expresión constitutiva o *housekeeping*), donde se encuentran varias copias de la secuencia GGGCGG que es reconocida por el factor de transcripción SP1. La expresión del gen de la uPA se induce por distintas señales, entre las que se incluyen factores de crecimiento presentes en el suero, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el de fibroblastos (FGF), hormonas esteroides, la luz ultravioleta y cambios en la morfología celular [138-140].

La región intensificadora más caracterizada del gen de la uPA se encuentra a unas - 2 Kb del punto de origen de la transcripción [141, 142]. Esta región está compuesta de un sitio Ets/API_A, un sitio API_B hacia 5' del promotor y un conector cooperativo (COM) de 74 pb entre ambas regiones. Se ha demostrado que los factores de transcripción que se unen al sitio Ets/API son activados por miembros de las MAPK ("mitogen-activated protein kinases") [143-145]. Se cree que el promotor de la uPA es muy sensible a una gran variedad de señales, ya que estas quinasas son activadas por distintas señales extracelulares como factores de crecimiento, citoquinas, estrés osmótico y radiación ultravioleta [146].

En la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA de la uPA, (también en uPAR, PAI-1, y PAI-2), se encuentra la secuencia ARE ("AU rich element") [147, 148]. Esta secuencia, rica en AU, marca al mRNA para una degradación rápida disminuyendo su estabilidad. Se ha descrito un aumento en la estabilidad del mRNA de la uPA en células metastáticas del cáncer de mama (con una vida media de 17 h), debido sobre todo a una disminución de la degradación del mRNA de la uPA mediada por las secuencias ARE [149].

Fisiopatología de la uPA

El estudio de ratones transgénicos deficientes en uPA [124, 150] ha permitido conocer algunos aspectos del papel de la uPA *in vivo*. Al igual que ocurre con el tPA, una deficiencia de uPA no parece alterar el desarrollo embrionario ni la fertilidad, aunque la deficiencia combinada de ambos activadores del plasminógeno, tPA y uPA, sí que dificulta el proceso de ovulación. Además, ratones transgénicos deficientes en uPA [140]

presentan una mayor susceptibilidad a la trombosis, una reducida vascularización, una reducción de la activación de las plaquetas y una reducción de la capacidad de invasión tumoral.

1. 2. 4. INHIBIDORES FIBRINOLÍTICOS

Se han descrito diversas proteínas capaces de inhibir la activación del plasminógeno, a las que se les ha denominado inhibidores de los activadores del plasminógeno, o PAIs. Éstos son el PAI-1 o endotelial [151], el PAI-2 o placentario [152] y el PAI-3, también conocido como el inhibidor de la proteína C activada (PCI) [153-155].

Estudios de homología demuestran que estos PAIs forman parte de la superfamilia de los inhibidores de las serín-proteasas o serpinas (*Serín proteinase inhibitor*). Las serpinas son proteínas con una alta homología derivadas de un gen ancestral común de hace unos 500 millones de años [156, 157]. Las serpinas mejor estudiadas son aquellas que se encuentran en el plasma humano donde actúan, en general, como inhibidores de serín-proteasas, las cuales son importantes en los procesos de coagulación, fibrinólisis, inmunidad e inflamación.

Las serpinas suelen formar complejos con sus proteasas diana con una estequiometría 1:1. Estos complejos son muy estables al calor y a la desnaturalización, y tanto la actividad inhibidora de la serpina como la catalítica de la proteasa se pierden tras la formación del complejo. Estos complejos expresan nuevos epítomos que participan en su reconocimiento y degradación y son quimioatrayentes para los neutrófilos y los monocitos [158].

El PAI-1 es el principal inhibidor fisiológico de los activadores tPA (mono- y bicatenario) y uPA (tc-uPA pero no sc-uPA) y juega un papel importante en la regulación de la fibrinólisis, ya que la mayoría del tPA plasmático se encuentra formando complejos con el PAI-1 [159, 160].

El PAI-2 [161, 162], por su parte, inhibe básicamente a la uPA. Se sintetiza en monocitos, macrófagos y en el tejido placentario y, bajo condiciones fisiológicas, resulta

indetectable su presencia en plasma en mujeres no gestantes. Esto sugiere que, en principio, su participación en la hemostasia debe circunscribirse a procesos muy concretos, como puede ser el caso de la gestación, manteniendo el estado hipofibrinolítico propio del embarazo. El PAI-2 inhibe al tPA y a la uPA, aunque con menor eficacia que el PAI-1. De hecho, no se han detectado complejos tPA:PAI-2 en plasma, ni aún siquiera durante la gestación, cuando la concentración de PAI-2 supera a la de PAI-1 [163, 164].

El PAI-3 [165] es capaz de inhibir a la uPA y al tPA de dos cadenas pero, aunque su concentración plasmática es muy superior a la de los otros PAIs (aproximadamente 5 µg/ml) [154], su actividad inhibidora a nivel fibrinolítico es menor, incluso en presencia de heparina [154, 166]. Además de a la APC, el PAI-3 inhibe a un gran número de serín-proteasas implicadas en la coagulación y la fibrinólisis como son: la trombina [154, 167], el factor Xa [154, 167], el factor XIa [154, 168], la calicreína [154, 168], la uPA [154, 155, 169], el tPA [154, 155], la tripsina y la quimiotripsina [170]. Sin embargo, el PAI-3 es incapaz de inhibir al factor XIIa y a la plasmina [154, 170]. También es capaz de inhibir serín-proteasas implicadas en la reproducción humana como la acrosina presente en el esperma [171] y el antígeno específico de próstata (PSA) [172]. Con todos ellos forma complejos de estequiometría 1:1 que son estables al SDS. Además, las reacciones de inhibición son estimuladas de 10 a 5000 veces en presencia de heparina y de glicosaminoglicanos [153, 154, 167, 170, 172].

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

El gen del PAI-1 se localiza en el cromosoma 7 en la posición q21.3-q22 [173], se expande a lo largo de 12 kb [174] codificado por 9 exones. Un análisis de su secuencia revela la presencia de varios puntos potenciales de poliadenilación que se adaptan a la secuencia consenso AATAAA. El análisis del mRNA del PAI-1 mediante Northern blot revela la existencia de dos transcritos de 3.2 y 2.3 kb de longitud aproximadamente [173, 175, 176]. Ambos RNAs codifican un PAI-1 idéntico, descartándose la posibilidad de un *splicing* alternativo.

La molécula precursora del PAI-1 tiene 402 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 23 aminoácidos. El corte de este péptido señal da lugar a la forma secretada del PAI-1 de 379 aminoácidos, el cual posee tres sitios potenciales de glicosilación, dando lugar a una glicoproteína con una masa molecular de unos 50 KDa rica en metionina y pobre en cisteína [159, 177].

Aunque se desconoce cuál es la principal fuente de producción de PAI-1, se ha comprobado que una amplia variedad de tipos celulares en cultivo (células endoteliales, células musculares lisas, plaquetas, hepatocitos, fibroblastos y adipocitos) pueden producir PAI-1 [151, 159].

El PAI-1 plasmático tiene su origen básicamente en las células endoteliales vasculares y en el hígado. El PAI-1 es una molécula bastante inestable, la cual circula en forma activa ligada a una proteína estabilizadora (vitronectina), siendo su vida media de unos 30 minutos [178]. Los gránulos α de las plaquetas constituyen la principal reserva de PAI-1 circulante (90%), conteniendo de 4000 a 8000 moléculas por plaqueta (100-200 ng/ml sangre) que se liberan por la acción del colágeno y ADP. Tan solo un 10% está presente en el plasma (alrededor de 10-20 ng/ml) [179-181]. El amplio rango de variación en los niveles normales de PAI-1 plasmático (0,5-40 U/ml) puede deberse a la liberación por parte de las plaquetas de parte del PAI-1 contenido en ellas durante el proceso de extracción.

También se ha descrito una forma inactiva, aunque intacta, del PAI-1 que puede reactivarse con agentes desnaturalizantes y subsiguiente renaturalización a la que se denomina PAI-1 latente [182].

El PAI-1 se une rápidamente al tPA y a la uPA en un ratio 1:1 [183], formando un complejo estable que se elimina de la circulación por las células hepáticas [184]. Por otro lado, se ha observado que la internalización de la uPA mediada por su receptor es dependiente de PAI-1. Existe un modelo propuesto para explicar este proceso según el cual la sc-uPA se uniría a su receptor y sería convertida en tc-uPA, la cual activaría al plasminógeno unido en superficie a plasmina. La presencia de PAI-1 bloquearía a la tc-uPA, frenando la producción de plasmina, mientras que el complejo uPA:PAI-1 sería

internalizado y degradado [185]. La generación controlada de plasmina unida a superficie puede modular la capacidad de las células para migrar e invadir tejidos, modulando las interacciones entre las células, la membrana basal y la MEC [123]. De este modo el PAI-1 controla la actividad proteolítica en la superficie celular y la localización física de uPAR en la membrana plasmática.

El PAI-1 es una proteína relativamente termoestable cuando se encuentra depositada sobre la matriz subendotelial [186], debido a su unión con la glicoproteína vitronectina [187].

El PAI-1 también es capaz de inhibir a la trombina en presencia de heparina no fraccionada (de elevada masa molecular) [188]. Parece que la inhibición de la trombina por parte del PAI-1, en presencia de heparina y de vitronectina, es importante para la regulación de procesos proteolíticos de la MEC. Se ha demostrado que el PAI-1 es capaz de unirse a la fibrina polimerizada de un modo específico, reversible y saturable [189-191]. Esto implica que todos los componentes básicos del sistema fibrinolítico están ensamblados sobre una fase sólida formada por polímeros de fibrina.

Regulación del PAI-1

La región flanqueante del gen del PAI-1 humano en dirección 5' ha sido extensamente caracterizada [174, 192, 193]. En esta región se localiza la caja TATA y toda una serie de secuencias con homologías con elementos reguladores conocidos, como la secuencia TRE (“*TPA response element*”, siendo el TPA: acetato de tetradecanoilforbol, también llamado PMA: acetato de forbol miristato) reconocida por el factor de transcripción AP-1 (“*activating protein 1*”). La AP-1 es una proteína heterodimérica compuesta por proteínas pertenecientes a las familias fos y jun, y a las subfamilias ATF (“*activating transcription factor*”) y JDP (“*Jun dimerization protein*”) [145].

Esta secuencia TRE se ha implicado en la inducción de la transcripción génica por ésteres de forbol [194, 195] y también se ha relacionado con la respuesta al factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α) y al factor transformante del crecimiento tipo β (TGF- β) [196, 197].

La expresión del PAI-1 se ha estudiado en distintos tipos celulares y tejidos y se han identificado numerosos factores que juegan un importante papel en la regulación de su síntesis. Muchos factores de crecimiento como el TGF- β , el del endotelio vascular (VEGF) y el de fibroblastos de tipo básico (bFGF), citoquinas inflamatorias como la interleuquina-1 (IL-1) y el TNF- α , hormonas (corticosteroides, insulina) y la proteína supresora de tumores p53, inducen las síntesis de PAI-1, aunque no se conoce con precisión los mecanismos por los cuales actúan estos factores [198-203]. También se han descrito diversos factores que están implicados en la estabilidad del mRNA del PAI-1, como son el TGF- β [204], la insulina [205], la hipoxia [206] y el cAMP [207].

Mediante estudios en células endometriales de mujeres con y sin endometriosis se ha observado que la progesterona incrementa la liberación de PAI-1 al medio en ambos grupos [208].

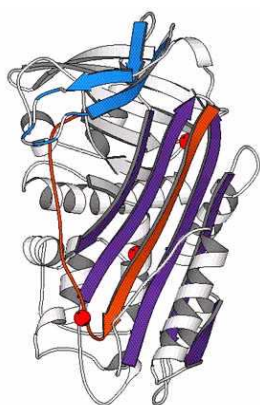


Figura 1. 7 Modelo estructural de la conformación de la molécula de PAI-1 en estado latente. Las flechas representan las regiones en hoja β y las espirales las regiones en α -hélice (Tucker y col [187]).

Fisiopatología del PAI-1

El PAI-1 se ha considerado como el principal regulador de la fibrinólisis *in vivo* [159, 160]. Se han observado con frecuencia niveles anormalmente elevados de PAI-1 en condiciones en las que el riesgo trombótico está aumentado, como la gestación [163, 209-212] y en ciertas complicaciones obstétricas como la preeclampsia [163, 213-216]. También

se detecta un aumento de sus niveles en el plasma de pacientes con trombosis venosa profunda [217, 218] y en pacientes con infarto de miocardio [219-223].

El PAI-1 también está implicado en los procesos tumorales [224-226]. En este sentido, es importante resaltar el papel que se le concede a la uPA y a su receptor, uPAR, en los procesos de migración y degradación proteolítica de la MEC durante el desarrollo de las metástasis. A pesar de no conocerse con detalle el significado de este hecho, los niveles de PAI-1 y uPA son considerados importantes parámetros pronósticos y pueden tener una creciente importancia terapéutica en algunos tipos de cáncer [227, 228].

La actividad fibrinolítica en el tejido endometrial humano es esencial en el proceso de regeneración tisular durante la menstruación [229]. La actividad plasmínica, regulada por el nivel de inhibidores, determina la proteólisis de las proteínas de la MEC, la activación de procloagenasas, y la degradación de diversos componentes de la membrana basal. Además, la progesterona produce una disminución de la actividad fibrinolítica del endometrio mediante el estímulo de la degradación de uPA y el aumento de PAI-1 y uPAR [129].

1. 2. 5. POLIMORFISMO -675 4G/5G DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DEL PAI-1 (rs1799768)

Las células de los explantes endometriales son capaces de proliferar e invadir *in vitro* una matriz de fibrina tridimensional, dando lugar a la formación de nuevas glándulas (inmunohistoquímicamente positivas para la citoqueratina), estroma (positivo para la vimentina), y vasos sanguíneos (positivos para el CD31), dando lugar a un modelo *in vitro* consistente con una endometriosis temprana [230]. De esta forma, distintos factores que lleven a la persistencia de la matriz de fibrina en la cavidad peritoneal podrían ser una causa importante de la endometriosis.

De acuerdo con este modelo *in vitro*, es posible que distintas variaciones genéticas en el sistema fibrinolítico creen un ambiente hipofibrinolítico en la cavidad peritoneal, lo que podría permitir la persistencia de una matriz de fibrina en dicha cavidad. Así, tras la llegada de los fragmentos endometriales a la cavidad peritoneal, mediante menstruación

retrógrada, estos se podrán adherir y crecer en esta matriz de fibrina persistente, dando lugar a la endometriosis.

El polimorfismo -675 4G/5G de la región promotora del gen del PAI-1 está formado por la inserción/delección de un solo nucleótido. El alelo 4G tiene una secuencia de cuatro guaninas y permite la unión de una proteína activadora de su transcripción perteneciente a la familia de los factores nucleares $\kappa\beta$. Sin embargo, el alelo 5G contiene cinco guaninas que constituyen un lugar adicional de unión a una proteína represora de la transcripción (Figura 1. 10). Hay varios estudios en los que se ha comprobado que los portadores homocigotos del alelo 4G poseen niveles plasmáticos de PAI-1 más elevados y una actividad fibrinolítica disminuida (hipofibrinólisis) frente a los homocigotos para el alelo 5G, mientras que los heterocigotos poseen niveles intermedios [231-234].

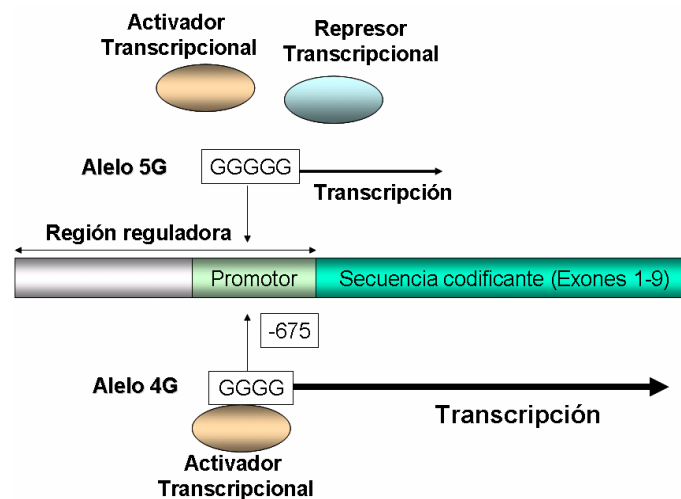


Figura 1. 8 Modulación de la tasa de transcripción del gen PAI-1 de acuerdo con el polimorfismo -675 4G/5G. El alelo 5G genera un lugar de unión adicional para una proteína represora que se solapa con el lugar de unión de la proteína activadora de la transcripción, lo que provoca una competencia por la unión al promotor que trae como consecuencia una menor tasa de transcripción del gen (Modificado de Kohler y Grant [235]).

La contribución del polimorfismo 4G/5G a los niveles plasmáticos de PAI-1 parece ser mayor en mujeres que en hombres [236]. Es más, el genotipo hipofibrinolítico 4G4G parece estar asociado a complicaciones en el embarazo incluyendo parto prematuro, parto

de mortinatos, aborto, restricción de crecimiento intrauterino (IUGR), eclampsia y desprendimiento prematuro de la placenta, probablemente al haber una menor eliminación de los depósitos de fibrina de la placenta [237]. Por otra parte, nuestro grupo ha estudiado este polimorfismo en otras patologías como el Behcet [238], sin encontrar asociación, o el infarto de miocardio [239] y la obesidad infantil [240], encontrando una mayor frecuencia del alelo 4G en los pacientes. También hemos observado que, después de la pérdida de peso en pacientes con obesidad mórbida, los pacientes portadores del alelo 4G presentaban unos niveles mayores de PAI-1 que los portadores de 5G [241]. Esta disminución de la adiposidad es responsable de la disminución de los niveles de PAI-1, pero que también puede estar influida por la mejora de los factores metabólicos [242].

Hay diversos estudios que relacionan variaciones del sistema fibrinolítico con la endometriosis [14, 94, 243]. Concretamente, nuestro grupo ha descrito unos niveles proteicos de PAI-1 más elevados en tejido endometriósico que en el endometrio de mujeres con y sin endometriosis [14].

Sin embargo, pese a estos estudios, aún se desconoce si estas alteraciones en el sistema fibrinolítico son una causa o una consecuencia de la endometriosis. El estudio de polimorfismos implicados en la expresión génica nos puede ayudar a desenmarañar esta incógnita, ya que una asociación significativa entre la presencia de un alelo y/o genotipo con la enfermedad nos permitirá establecer un vínculo de causalidad entre la presencia de un alelo y/o genotipo con el desarrollo, la extensión y/o la recurrencia de la endometriosis.

La hipótesis de nuestro grupo es que este polimorfismo puede contribuir a incrementar la expresión del PAI-1 en tejido endometrial y/o en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, produciendo un ambiente peritoneal hipofibrinolítico en el que no se eliminarían los depósitos de fibrina peritoneales, lo que facilitaría la adhesión de los fragmentos endometriales llegados por menstruación retrógrada.

Hay que destacar que al comienzo de esta tesis no había ninguna publicación con respecto a la influencia del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 en la endometriosis.

1. 2. 6. FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

El sistema fibrinolítico está implicado en numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos, que incluyen la ovulación, la embriogénesis, la migración celular, la lisis del coágulo, la angiogénesis, la cicatrización y la progresión tumoral [85, 107, 244]. Los procesos patológicos más estudiados, en los cuales está implicado el sistema fibrinolítico, son las enfermedades cardiovasculares y la invasión y la metástasis tumoral [140, 245].

Estudios con ratones deficientes en algunos de los componentes del sistema fibrinolítico han confirmado su implicación no sólo en enfermedades cardiovasculares, sino en alteraciones en la reproducción, en el desarrollo embrionario, en la cicatrización, en la infección, en la función cerebral y en el cáncer [246-248].

Al igual que en el cáncer, en la endometriosis hay migración de tejido, adhesión, invasión y angiogénesis. La uPA, además de degradar la MEC, permitiendo así la invasión del tejido endometrial, puede estimular el resto de funciones. Distintos estudios en cáncer han mostrado que la capacidad de las células tumorales para invadir y metastatizar puede reducirse mediante el uso de inhibidores de la uPA, de anticuerpos anti-uPA, de antagonistas del uPAR o mediante la expresión de secuencias antisense de uPA y uPAR. Esta capacidad también puede incrementarse mediante la sobreexpresión de uPA [249-253]. En cuanto a la implicación de los inhibidores fibrinolíticos en el cáncer, puesto que son capaces de inhibir a la uPA, cabría esperar que impidieran la invasión y la metástasis. De acuerdo con lo anterior, se ha descrito que la sobreexpresión de PAI-1 reduce la formación de metástasis [254, 255]. Sin embargo, otros estudios han indicado que el PAI-1 promueve, más que inhibe, la invasión y la metástasis. Por ejemplo, los niveles de mRNA y proteína uPA y PAI-1 aumentan significativamente en tumores de cáncer de mama con el estadio pTNM [256]. Los niveles proteicos de PAI-1 [256-258] y los de uPA [257, 258], fueron mayores en aquellas pacientes con cáncer de mama que sufrieron una recidiva, lo que sugiere que ambos se asocian con un pronóstico menos favorable en este grupo de pacientes. En otros estudios, la deficiencia de PAI-1 en ratones disminuyó la angiogénesis, y ratones deficientes de PAI-1 presentaron una disminución en la angiogénesis e impidió la invasión celular [259]. Los posibles mecanismos por los cuales el PAI-1 puede contribuir a la diseminación del

cáncer son impidiendo el exceso de la degradación de la MEC, modulando la adhesión celular [260], jugando un papel en la angiogénesis [259] y estimulando la proliferación celular [261].

1. 2. 7. CAMBIOS FIBRINOLÍTICOS EN LA ENDOMETRIOSIS

1. 2. 7. 1. Tejido endometrial eutópico

El endometrio humano es un tejido dinámico que sufre modificaciones periódicas durante el ciclo menstrual. Este tejido responde cíclicamente al estímulo estrogénico con una proliferación, y al estímulo de la progesterona induciendo una diferenciación e inhibiendo la proliferación endometrial dependiente de estrógeno [262]. La estimulación *in vitro* de las células estromales con progesterona reduce la liberación y la activación de las MMPs [263] y aumenta la síntesis de componentes como el colágeno, la laminina, y la fibronectina [264, 265]. Por todo ello, debido a una combinación de síntesis aumentada y degradación disminuida, la MEC se consolida en la fase secretora.

Se han descrito modificaciones en la expresión de uPA en función de la fase del ciclo menstrual, en particular un aumento de la actividad fibrinolítica durante la menstruación [133, 266-268]. Posteriormente, este hecho se ha comprobado tanto en el endometrio eutópico como en el tejido endometriósico de las mujeres con endometriosis [13].

El sistema fibrinolítico sufre variaciones en función del estado hormonal de la paciente, por lo que cualquier tratamiento con esteroides debe ser tomado en consideración. El tratamiento con estradiol y progesterona en cultivos de células estromales endometriales aumenta el número de receptores celulares de superficie para la uPA [129, 269]. Además, la progesterona induce un aumento de la liberación de PAI-1 lo que determina la formación de una mayor cantidad de complejos uPA:PAI-1. La eliminación y degradación de estos complejos de la superficie celular es más eficiente que la de la uPA libre. La combinación de un mayor número de receptores de superficie y la disminución de la uPA libre podría explicar la reducción de la actividad de la plasmina en

un ambiente con influjo estroprogestativo [129]. La consecuencia directa de una baja actividad de la uPA en el endometrio secretor es una disminución en la degradación de la MEC significativa. De esta forma se evita la menstruación y se aseguran condiciones óptimas para la implantación del embrión. La baja actividad fibrinolítica observada durante la fase secretora se altera por la caída de la progesterona al final de esta fase dando lugar a mayores niveles de uPA y tPA. Esta activación del sistema fibrinolítico puede incrementar los mecanismos proteolíticos implicados en la menstruación [8].

Aunque el PAI-1 es también inhibidor del tPA, la concentración de este último no sufre las variaciones observadas en la uPA por la acción de la progesterona. A pesar de esto, se ha comprobado que los niveles de tPA aumentan premenstrualmente, posiblemente en relación con la eliminación de la fibrina formada [270-273].

Los factores de crecimiento y las citoquinas pueden modular la concentración de los activadores e inhibidores del plasminógeno [122]. El EGF aumenta la concentración de uPA [274], mientras que el TGF- β aumenta la concentración de PAI-1 y produce un efecto inhibitor del crecimiento de las células epiteliales [122]. Sin embargo, a pesar de los múltiples mecanismos de regulación paracrina de la actividad de la plasmina, los determinantes finales de dicha actividad son los activadores e inhibidores de activadores del plasminógeno. Los activadores del plasminógeno se encuentran dentro del endometrio en localizaciones más específicas que el plasminógeno. Se ha comprobado que el tPA se expresa en el endotelio vascular del endometrio, mientras que el sc-uPA está además presente en las membranas basales del epitelio glandular y de superficie [140].

Aunque en los estudios de extractos de tejido endometrial se observa una presencia mayoritaria de tPA, sugiriendo que la actividad plasmínica se debe al tPA, en los estudios con cultivos tisulares se produce una mayor liberación de uPA que de tPA al medio, de forma que la actividad plasmínica en este medio se debe principalmente a la uPA. Este hecho puede deberse a las distintas formas de almacenamiento intracelular de los dos activadores, o a la presencia de sc-uPA (forma liberada inactiva), inmunológicamente distinta de la tc-uPA [266]. Estudios en cultivos celulares han mostrado que la uPA está localizada en lugares de unión al sustrato y en los puntos de anclaje intercelular, de ahí su

importancia para el proceso de migración e invasión celular [275, 276]. Así pues, para determinar los niveles totales de uPA sería importante utilizar técnicas que permitieran la extracción completa de la proteína de la fracción citosólica y de membrana en el tejido estudiado.

1. 2. 7. 2. Tejido endometriósico

La disponibilidad de plasminógeno es esencial para que la plasmina ejerza su efecto de remodelado tisular y active las proMMPs. Existen niveles elevados de plasminógeno en las células endometriales y en la MEC tanto del tejido uterino como del endometrio ectópico de las mujeres con endometriosis, lo que sugiere que estos tejidos presentan un elevado potencial proteolítico. Por el contrario, la expresión de plasminógeno es débil en el estroma de los tejidos ovárico y peritoneal en los que se ha implantado endometrio ectópico [277].

Aunque, como se ha comentado anteriormente, el sistema fibrinolítico sufre variaciones en función del estado hormonal, mediante técnicas de inmunohistoquímica no se han detectado cambios en la expresión de PAI-1 y PAI-2 en el endometrio ectópico y eutópico al comparar la fase proliferativa y la secretora [278, 279]. Tampoco se han encontrado diferencias significativas en el patrón de tinción del plasminógeno, uPA o tPA en función del momento del ciclo. La incapacidad para detectar estos cambios por inmunohistoquímica puede deberse, bien a una baja sensibilidad de los anticuerpos utilizados, o bien a la falta de almacenamiento de los PAIs en las células endometriales. Por otra parte, estos medios presentan el inconveniente de no poder realizar una cuantificación precisa de los niveles proteicos reales en el tejido.

Casslen y col [129] observaron un efecto negativo de la progesterona en la expresión de activadores del plasminógeno, debido al aumento de la expresión de PAI-1 y de uPAR en la superficie celular. La formación de complejos uPA:PAI-1 y su unión al receptor facilita el aclaramiento de plasmina activa. Estudios *in vitro* no han encontrado diferencias en los niveles de uPA, PAI-1 y PAI-2 en endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis aunque sí han mostrado un aumento de la expresión de PAI-1 en presencia de progesterona [243, 280] y un aumento de la secreción de suPAR en las células endometriales

de las mujeres con endometriosis [243]. Se ha argumentado que este último hallazgo podría aumentar la disponibilidad local de uPA mediante el enlentecimiento de su inhibición por el PAI-1 [243].

La cuantificación proteica, mediante técnicas de ELISA, ha mostrado una mayor concentración de uPA y PAI-1 en endometrio de mujeres con endometriosis que en el endometrio de controles. Estos niveles son todavía mayores al estudiar muestras de tejido endometriósico [94]. La mayor concentración de uPA en el endometrio de mujeres con endometriosis podría llevar a una anormal degradación del tejido endometrial durante la menstruación. De esta manera, se originarían fragmentos de tejido endometrial con un potencial mayor para degradar la MEC que en la mujer sana, lo que facilitaría su implantación [281, 282]. Sin embargo, los niveles de uPA en cultivos de células endometriales estromales son menores en el tejido eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis y su expresión se mantiene estable en el tiempo [208]. Este hecho podría explicarse por la ausencia de factores reguladores *in vitro*, como es el caso de la progesterona.

Existen evidencias de que la endometriosis es una enfermedad estrógeno-dependiente, pero los datos sobre el efecto de los estrógenos en la producción de uPA, uPAR y PAI-1 son conflictivos. La expresión de uPA está aumentada en la fase proliferativa en el tejido adenomiótico [13]. Sin embargo, el cultivo de células endometriales estromales *in vitro* con dietilestilbestrol no produce cambios significativos en los niveles de uPA, PAI-1 o uPAR [243].

Por el contrario, otros autores han sugerido que el tejido endometriósico no es tan estrógeno-dependiente como el endometrio normal, quizás como consecuencia de un defecto en el metabolismo esteroideo [283, 284]. La expresión de aromatasa es aberrante en el tejido endometriósico y existe una deficiencia en 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que produce un aumento de la concentración tisular de estradiol [285]. Estudios en animales han demostrado que el estradiol no es necesario para el proceso de implantación [286, 287]. Sin embargo, sí parece ser determinante en la proliferación y crecimiento del tejido endometriósico [288].

1. 2. 7. 3. Líquido peritoneal

El tejido peritoneal lesionado contiene depósitos de fibrina en superficie, exudado de células blancas y tejido mesotelial necrótico. Cuando la fibrina es degradada por el sistema fibrinolítico, el peritoneo se repara sin dar lugar a la formación de adherencias. Sin embargo, en presencia de residuos de fibrina, debido a una cantidad inicial de fibrina excesiva o una actividad fibrinolítica disminuida, se produce una activación de fibroblastos con producción de fibrosis y adherencias intraabdominales [289]. Existe una amplia variedad de células en la cavidad peritoneal capaces de expresar componentes del sistema fibrinolítico [290, 291]. Los macrófagos producen tPA, PAI-1 y sus receptores, pero el mayor contribuyente a la actividad fibrinolítica del abdomen son las células mesoteliales [292, 293]. Estas células expresan fundamentalmente activadores fibrinolíticos y por ello son cruciales para el mantenimiento de la integridad peritoneal.

La barrera peritoneal sufre un proceso de remodelado muy similar al de la herida del tejido cutáneo (Figura 1. 9). Diversos estudios en deficiencias de uPAR y tPA han demostrado que el déficit de uPAR:tPA produce una alteración del proceso de cicatrización menos severa que el déficit de uPA:tPA [294]. Estos trabajos sugieren que la uPA es suficiente, por sí misma, para eliminar los depósitos de fibrina y permitir el proceso de cicatrización. Por otra parte, el déficit de plasminógeno causa un retraso en el proceso de cicatrización debido tanto a una alteración en la migración de los queratinocitos como a un déficit de angiogénesis. Además, el trauma tisular y la isquemia aumentan la formación de adherencias, ya que inducen una reducción de la actividad fibrinolítica peritoneal. Este efecto es debido fundamentalmente a una disminución en los niveles de tPA y a un aumento del nivel de PAI-1 en el líquido peritoneal, y puede observarse también en procesos inflamatorios peritoneales o tras una intervención quirúrgica sobre el abdomen [292, 295]. Por otra parte, la administración intraoperatoria de tPA ha demostrado ser capaz de prevenir la formación de adherencias, sin interferir con el proceso de cicatrización peritoneal [296-298].

El hallazgo de niveles de tPA y uPA aumentados en el líquido peritoneal en mujeres con endometriosis o adherencias peritoneales establecidas podría sugerir una

activación secundaria del sistema fibrinolítico para limitar la formación de nuevas adherencias [299]. La administración intraperitoneal de anticuerpos anti PAI-1 ha demostrado reducir la incidencia de adherencias tras una lesión quirúrgica del peritoneo, probablemente por limitar la disponibilidad de PAI-1 para la inhibición del tPA [300].

Existen resultados conflictivos en la literatura en relación a la actividad fibrinolítica en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis [301]. Algunos autores han descrito que la actividad de los activadores del plasminógeno es similar en el líquido peritoneal de pacientes con o sin endometriosis [302]. Sin embargo, Astedt y Nordenskjold [303] encontraron un aumento en los niveles de activadores del plasminógeno en el líquido peritoneal de las mujeres con esta enfermedad.

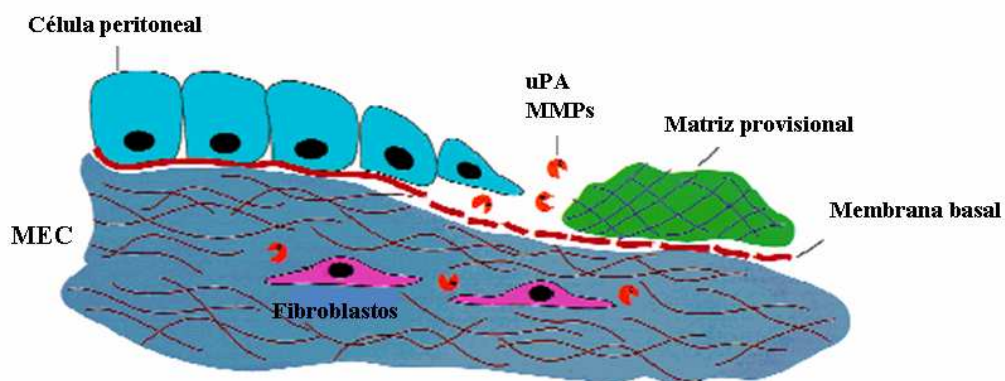


Figura 1. 9 Mecanismo de regeneración peritoneal. El modelo de regeneración cutánea tras una herida traumática se podría aplicar básicamente al proceso de reparación peritoneal tras sufrir una agresión externa (MEC: matriz extracelular; MMPs: metaloproteasas matriciales; uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa).

Al estudiar los inhibidores fibrinolíticos en el líquido peritoneal se observan resultados diversos que varían en función de la técnica utilizada y el estadio de la enfermedad. Bruse y col [94] encontraron una mayor concentración de PAI-2 en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis al compararla con la de las mujeres libres de enfermedad. Estos resultados podrían explicarse por la existencia de una mayor

actividad de los macrófagos peritoneales en las mujeres con endometriosis que serían responsables del aumento de la secreción de PAI-2 al medio peritoneal. Por el contrario, cuando se estudian exclusivamente los estadios iniciales de la enfermedad, con presencia de implantes peritoneales pero sin síndrome adherencial asociado, se evidencia una disminución de los niveles de PAI-2 en líquido peritoneal [94]. Además, los niveles proteicos de PAI-2 aumentan tras la liberación quirúrgica de las adherencias [299].

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

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

1. 3. ENDOMETRIOSIS Y SISTEMA DE LAS METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

1. 3. 1. LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

La MEC es una compleja estructura glicoproteica que sirve de soporte celular y confiere una ultraestructura tridimensional específica a cada tejido. Además de su función estructural, la MEC funciona como un medio para el transporte de señales celulares que modulan procesos tan diferentes como la angiogénesis, la proliferación y migración celular, las respuestas inflamatorias e inmunológicas y los procesos de reparación tisular [304, 305].

La composición de la MEC no es estática. Existe un proceso de regeneración continua en el que participa un complejo sistema de enzimas con una regulación específica. El descubrimiento de citoquinas, factores de crecimiento y de potentes proteínas funcionales que se expresan en el seno de la MEC demuestra la relevancia de la misma en el proceso de comunicación intercelular. A su vez, la regulación paracrina descrita por algunos autores resulta fundamental para la correcta homeostasis de cada uno de los tejidos de nuestro organismo [306, 307].

La MEC está formada por dos clases principales de macromoléculas: 1) cadenas de polisacáridos de tipo glicosaminoglicanos (GAG), normalmente unidas a proteínas mediante enlaces covalentes formando los proteoglicanos, y 2) proteínas formadoras de fibras pertenecientes a dos tipos funcionales, unas con características fundamentalmente estructurales (colágeno y elastina) y otras adhesivas (como la fibronectina y la laminina) [308].

Las moléculas de GAG y proteoglicanos forman una “sustancia fundamental”, altamente hidratada, que presenta propiedades de gel y en la que están embebidas las proteínas fibrosas. Esta fase acuosa del gel permite la difusión de metabolitos, nutrientes y hormonas entre la sangre y las células que forman los tejidos. El gel de polisacáridos confiere resistencia frente a las fuerzas de compresión de la MEC, mientras que las fibras de colágeno oponen resistencia a la tracción y la elastina confiere elasticidad. Las proteínas adhesivas son intermediarias en el anclaje de las células a la MEC. De esta

forma, la fibronectina participa en la adhesión de fibroblastos y de otras células a la MEC en el tejido conjuntivo, mientras que la laminina favorece la unión de las células epiteliales a la lámina basal [308].

El colágeno, del que se han identificado más de 20 tipos diferentes, es la proteína más abundante en la MEC. La estructura tisular en los mamíferos está compuesta fundamentalmente por colágeno tipo I, que ha mantenido una secuencia de aminoácidos constante a lo largo del proceso evolutivo [309]. Aunque los otros tipos de colágeno están presentes en menor cantidad, son éstos los que confieren a la MEC las propiedades mecánicas y estructurales que permiten el proceso de reparación tisular. La membrana basal, en la interfase entre las células epiteliales y la MEC, está formada principalmente por colágeno tipo IV [308].

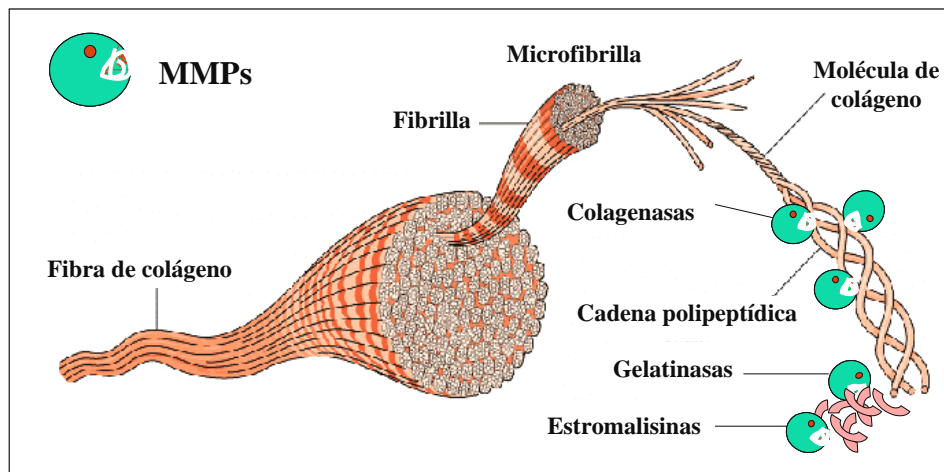


Figura 1. 10. Estructura de colágeno humano. El colágeno es el componente más abundante de la MEC. Las metaloproteasas matriciales (MMPs) tipo colagenasa, son capaces de actuar sobre la triple hélice helicoidal de la fibra de colágeno y degradarla. Los productos resultantes de la acción de las colagenasas se desnaturalizan rápidamente en gelatina, la cual es a su vez susceptible de la acción de otras MMPs, como las gelatinasas y las estromalinas.

La matriz extracelular (MEC) en el endometrio.

El tejido endometrial humano se remodela durante el ciclo menstrual. Tras la menstruación, en la fase preovulatoria, se produce la recuperación del estrato funcional de endometrio mediante re-epitelización, división celular y producción de MEC, principalmente bajo la estimulación del estrógeno ovárico. Tras la ovulación, el tejido endometrial regenerado se diferencia, bajo la influencia de la progesterona y el estrógeno, preparándose para la implantación del embrión. Si se produce esta implantación aún hay una mayor diferenciación del estroma, que se decidualiza. Si el embrión no se implanta en el endometrio, los niveles de estrógeno y progesterona disminuyen rápidamente e inducen la menstruación [310-312].

Así pues, durante el ciclo menstrual se producen cambios profundos en la arquitectura endometrial en respuesta a cambios del ambiente hormonal. Estos cambios en la composición celular relativa, en la composición de la MEC (cuantitativa y cualitativa) y en la interacción entre la MEC y las células endometriales, son necesarios para una correcta implantación del embrión, invasión de las células trofoblásticas en el endometrio decidualizado, y el mantenimiento del embarazo [313].

Se ha observado en distintos estudios que la adhesión celular mediada por integrinas puede afectar la proliferación celular e incluso la viabilidad celular [314-316], en el caso del endometrio se ha observado, que tanto las células estromales [311] como las epiteliales [312] expresan integrinas en su superficie, las cuales actúan como receptores de componentes específicos de la MEC. Estas interacciones regulan la viabilidad y proliferación de estos tipos celulares [311, 312].

Los componentes mejor caracterizados de la MEC en el endometrio son los colágenos, la fibronectina y la laminina [310, 313, 317]. De los 28 tipos de colágeno conocidos [318] los de tipo I, III, IV, V y VI se han detectado en el endometrio humano [310, 313, 317, 319].

Aunque hay discordancia en los estudios de composición relativa del endometrio a lo largo del ciclo menstrual, lo que nos indican los distintos estudios es que los colágenos

de tipo I, III y V están presentes intersticialmente a lo largo de todo el ciclo menstrual en forma de fibrillas en la fase proliferativa y secretora que posteriormente formarán un sistema de canales entre las células de la decidua [310, 313]. Estos canales permitirán movimientos celulares, principalmente de leucocitos [310]. Por otro lado, las células de la decidua, que son las mayores productoras de colágeno, sintetizan predominantemente colágeno de tipo V y de tipo I y menores cantidades de colágeno de tipo III [313].

Mientras que los estudios de inmunohistoquímica indican el contenido relativo y la distribución de los colágenos [310, 313, 317, 319], los cuales tienen una vida media de años, el estudio de los niveles de RNA es importante para conocer la tasa de producción de estos colágenos en el endometrio a lo largo del ciclo menstrual [320]. La disminución de colágeno de tipo I en el endometrio en fase secretora puede ser uno de los cambios que preparan al endometrio para la implantación [320].

Mientras que por un lado se ha observado una disminución del colágeno tipo V en la decidua [310], por otro lado se ha observado justo lo contrario [313]. Así, mientras unos autores indican que la reducción general en la densidad de la red fibrilar se debe a la disociación del colágeno de tipo V, que actúa regulando el diámetro de las fibrillas de colágeno de tipo I y III [310], otros autores indican que aumento de colágeno tipo V podría regular la función de las células estromales de la decidua [313]. Esta regulación se debería a la mayor capacidad de unión a insulina [321], a heparina/heparán sulfato [322], que los colágenos de tipo I, II, III o IV, o que la fibronectina y laminina. Esta insulina unida a colágeno de tipo V retiene su actividad mitogénica [321] y la heparina/heparán sulfato modula la actividad del VEGF-A [323] y bFGF [324, 325]. Estos hallazgos sugieren que el colágeno de tipo V es importante en la compartimentalización, almacenamiento, estabilización y modulación de las actividades de varios factores de crecimiento. El colágeno de tipo V también se une a la TSP-1 [326], estas interacciones con la TSP-1 y con el heparán sulfato también pueden ser importantes en el ensamblaje de la MEC y en la regulación de sus funciones biológicas.

Mientras que en algunos estudios de inmunohistoquímica se observa una pérdida de colágeno de tipo VI en la MEC intersticial del estroma predecidualizado y decidualizado

[310], en otros se observa una expresión difusa pero mantenida a lo largo del ciclo menstrual e incluso un aumento en el endometrio decidualizado [313]. En estudios de hibridación in situ se ha comprobado que las tres especies de mRNA que codifican las cadenas $\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI) y $\alpha 3$ (VI) se transcriben en las células del estroma endometrial y en las células vasculares, pero al formarse la decidua se detecta una disminución en la producción de estos tres mRNAs en estos tipos celulares [327]. Así, una pérdida de colágeno tipo VI durante la fase secretora tardía (predecidua) se debería a un mecanismo postranscripcional.

Con respecto a la fibronectina y la vitronectina, mientras que la primera persiste en el endometrio humano durante la decidua, por lo que se cree que tiene un papel importante en la unión del trofoblasto, la vitronectina, que también posee propiedades de anclaje celular, no está presente en la MEC intersticial en la decidua [310].

La laminina y el colágeno tipo IV son los componentes mayoritarios de la membrana basal de los epitelios y, consecuentemente, también se localizan en las membranas basales de los epitelios luminal y glandular del endometrio y del endotelio vascular [310, 313]. Además en las células estromales del endometrio, a partir de la fase secretora tardía se produce una acumulación pericelular progresiva de componentes de la membrana basal (colágeno tipo IV, laminina y heparán sulfato), llegando a formar una estructura similar a una membrana basal en las células deciduales maduras [310-313, 328-331].

Parece ser que las células estromales endometriales, pero no las epiteliales, expresan laminina y colágeno IV, lo que sugiere que, tanto la laminina como el colágeno de tipo IV se producen en las células estromales y son posteriormente transportados a los espacios intercelulares y a la membrana basal subepitelial [311]. El número de células estromales endometriales que expresan laminina y colágeno de tipo IV aumenta significativamente durante las fases proliferativa tardía y secretora tardía (solo cuando estas células se decidualizan) [311], aunque previamente se había descrito que la laminina inhibe la decidua de las células estromales endometriales [332, 333]. Además, hay pocas células estromales que expresan estos componentes en endometrio

postmenopausico [311]. Estos resultados sugieren que las hormonas esteroideas regulan la producción de laminina y colágeno en las células estromales endometriales. De esta forma, al controlar la producción de componentes de la MEC en las células estromales endometriales, también controlan su proliferación, diferenciación y viabilidad [311].

La presencia de laminina en la membrana basal disminuye durante la fase secretora, pero solo en el epitelio luminal, no en el glandular ni en el endotelio vascular. Es más, tras la menopausia, la presencia de laminina está muy disminuida en el endotelio vascular pero no en el epitelio endometrial [312]. Estos resultados parecen indicar que la actividad proteolítica específica de la laminina, observada tanto en el epitelio endometrial durante la fase secretora como en el endotelio vascular en endometrio postmenopáusico, no está regulada por hormonas esteroideas, ya que no se observan cambios en la expresión de laminina en todas las membranas basales del endometrio [312].

Sin embargo, la expresión de colágeno de tipo IV disminuye significativamente en todas las membranas basales (del epitelio luminal y glandular y del endotelio vascular) durante la fase proliferativa, lo que indica que la actividad proteolítica específica del colágeno IV está regulado, al menos parcialmente, por hormonas esteroideas.

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

1. 3. 2. 1. Estructura y biología de las MMPs

La correcta homeostasis de la MEC está regulada por la existencia de un tipo de enzimas proteolíticas conocidas como las MMPs. La asociación de estas MMPs con sus inhibidores se denomina sistema de las MMPs. Las MMPs forman una familia de enzimas zinc-calcio dependientes que son capaces de degradar colectivamente la mayoría de las proteínas de la MEC a un pH neutro [334, 335].

Las MMPs contienen diversos dominios estructurales [336] (Figura 1.11):

1.- **Péptido señal:** es la secuencia responsable de la secreción de la molécula y no está presente en el proenzima.

2.- **Propéptido:** es esencial para mantener la proMMP en forma latente. Este dominio posee entre 80 y 90 aminoácidos y contiene una secuencia activadora (“Cys switch”), cuyo grupo tiol de la cisteína interacciona con el ión zinc del dominio catalítico. Esta interacción mantiene a las MMPs inactivas y la proteólisis de este propéptido da como resultado el enzima activo [337, 338].

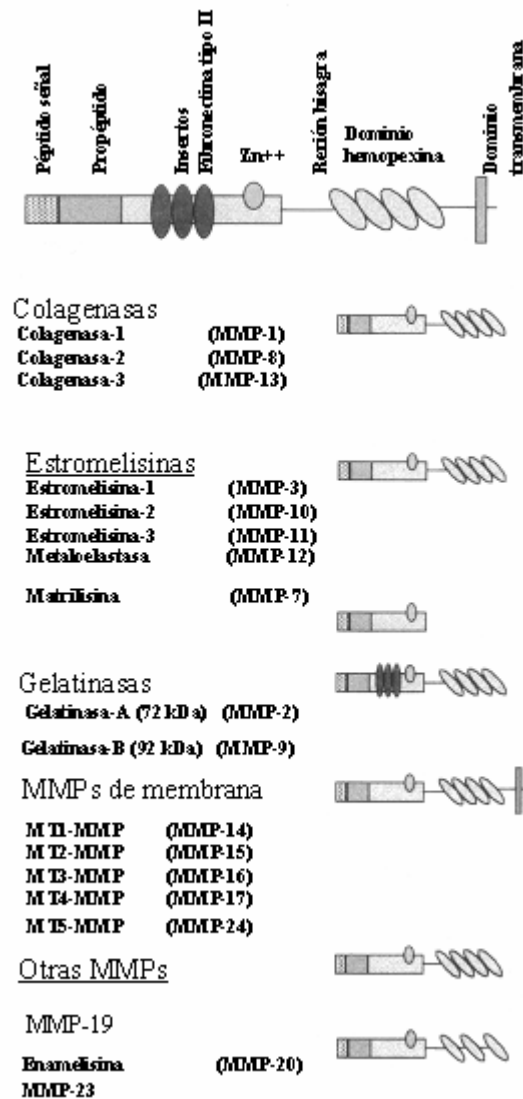


Figura 1. 11. Estructura de las metaloproteasas humanas [336].

3.- **Dominio catalítico:** de unos 170 aminoácidos, contiene dos iones zinc y al menos un ión calcio. Uno de los iones zinc está implicado en el proceso catalítico de las MMPs y se encuentra en el centro activo unido a la secuencia altamente conservada, el “motivo de unión al zinc”.

4.- **Región bisagra (hinge región):** de longitud variable, es una región rica en prolinas que une el dominio catalítico con el dominio tipo hemopexina.

5.- **Dominio tipo hemopexina:** de unos 200 aminoácidos, es el responsable de la especificidad de sustrato de las MMPs. Está altamente conservado y muestra una secuencia similar a la proteína plasmática hemopexina. Esta región juega un importante papel en las interacciones entre las MMPs y sus sustratos y entre las MMPs y sus inhibidores tisulares (TIMPs).

1. 3. 2. 2. Clasificación de las MMPs

Dependiendo de la especificidad del sustrato y de su estructura (presencia de determinados dominios), las MMPs se pueden clasificar en varios subgrupos [336, 339] (Figura 1.11):

1.- **Colagenasas:** degradan a la mayoría de los distintos tipos de colágeno. Su acción sobre el colágeno fibrilar produce una lisis de la molécula helicoidal, lo que causa un cambio en su estabilidad. Los productos resultantes de la acción de las colagenasas se desnaturalizan rápidamente en gelatina, la cual es a su vez susceptible de la acción de otras enzimas, como las estromelisin y las gelatinasas. Además, pueden digerir otras moléculas de la MEC y proteínas solubles.

2.- **Gelatinasas:** tienen la capacidad de degradar los constituyentes principales de las membranas basales, como el colágeno tipo IV, la laminina y la fibronectina. Estas MMPs juegan un papel importante en la degradación final de las fibras del colágeno después de la actuación de las colagenasas sobre el colágeno y su desnaturalización. Además, la MMP-2 digiere colágenos tipo I, II y III con afinidad similar a las colagenasas [340]. La actividad colagenasa de la MMP-2 parece concentrarse en la superficie celular,

donde se recluta y posteriormente se activa por las metaloproteasas de membrana (MT-MMPs) [341].

3.- **Estromelisin**s: estas enzimas son capaces de degradar un gran número de sustratos de la MEC, como proteoglicanos, proteínas funcionales distintas al colágeno como la laminina y la fibronectina y las regiones no helicoidales del colágeno IV. Además, la MMP-3 y la MMP-10 ejercen su actividad enzimática sobre otras MMPs, factores de crecimiento, y citoquinas. Esta actividad permite a las MMPs regular el crecimiento tisular, no sólo limitando las interacciones entre la MEC y la célula, sino también regulando la biodisponibilidad de factores de crecimiento en la misma. Concretamente, la MMP-3 puede degradar un amplio rango de sustratos de la MEC como agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, tenascina-C, vitronectina y colágeno tipo II, III, IV, IX, X, XI [342-344]. Además, la MMP-3 es capaz de activar a otras MMPs, como las MMPs -1, -7, -8 -9 y -13, al TNF- α , al inhibidor de proteasas α_1 y a la proteína básica de mielina [343], y de inactivar a la IL-1 β [345]. La MMP-3 es, a su vez, capaz de generar angiostatina a partir del plasminógeno, pudiendo limitar la angiogénesis [346].

La MMP-11 posee una secuencia de activación por furina RX[R/K]R en el extremo C-terminal del péptido pudiendo activarse intracelularmente [347]. Esta isoforma intracelular, de función aún desconocida, se produce por splicing alternativo, de forma que no tiene ni el péptido señal ni el predominio [348].

4.- **Matrilisinas**: Carecen del dominio de tipo hemopexina. La MMP-7 (matrilisina 1) se sintetiza en las células epiteliales y se secreta apicalmente. Además de algunos componentes de la MEC, procesa moléculas de la superficie celular como el pro-TNF α y la E-cadherina [341]. La MMP-26 (matrilisina 2) se expresa en el endometrio y en algunos carcinomas. Digiere varias moléculas de la MEC y, al contrario que la mayoría de las MMPs, se almacena intracelularmente [349].

5.- **Metaloproteasas de membrana (MT-MMPs)**: incluyen a cuatro proteínas transmembrana (MMP-14, -15, -16 y 24) y dos proteínas ancladas a la membrana

plasmática mediante una cola GPI (MMP-17 y -25), todas ellas capaces de degradar componentes de la matriz extracelular. Todas contienen una secuencia de reconocimiento por furina RX[R/K]R en el extremo C-terminal del propéptido, de forma que se activan intracelularmente antes de expresarse en la superficie. La función principal de este tipo de MT-MMPs es activar a la MMP-2.

6.- **Otras:** en este grupo se incluyen siete MMPs que por estructura o especificidad de sustrato no se incluyen en ninguno de los subgrupos anteriores, y su función aún es bastante desconocida. Entre las MMPs de este grupo se encuentran la MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27 y -28.

1. 3. 2. 3. Regulación de las MMPs

La expresión de las MMPs está regulada a nivel transcripcional, aunque también se ha descrito el control de la estabilidad del mRNA de MMPs por factores de crecimiento y citoquinas. La actividad proteolítica está regulada por la activación de sus zimógenos y por la específica inhibición de proteínas como TIMPs, α_2 -macroglobulina e inhibidor de proteasas α_1 [336].

La expresión de la mayoría de las MMPs es regulada a nivel transcripcional por diversos factores como citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y por contacto con la MEC [336]. También se ha descrito que la expresión de la MMP-3 se incrementa por la luz ultravioleta [350]. Los promotores de los genes de estas MMPs contienen la secuencia reguladora AP-1. La inducción de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos, que se unen a la secuencia AP-1, está mediada por MAPKs (“mitogen-activated protein kinases”). El equilibrio entre las distintas cascadas de las MAPKs regula el crecimiento celular, la diferenciación, la supervivencia y la muerte celular [336].

1. 3. 2. 4. Activación e inhibición de las MMPs

La mayoría de las MMPs se sintetizan como pre-proenzimas. Durante la propia síntesis de la molécula se elimina el péptido señal generándose la proMMP, que es secretada como un precursor latente (zimógeno), el cual es activado proteolíticamente en el espacio extracelular dando lugar a las MMPs [351]. La conformación de la forma

latente se mantiene por el plegamiento del propéptido sobre el centro catalítico, que permite establecer un enlace covalente entre la cisteína presente en el propéptido y el zinc catalítico y actuar como un escudo del centro catalítico [352]. Hay trece MMPs que se comportan de esta forma (colagenasas, gelatinasas, estromelinas 1 y 2, matrilisinas y las MMPs -12, -19, -20 y -27) y son aquellas que no tienen la secuencia de reconocimiento para furina. Así pues, la activación extracelular de estas proMMPs es un punto de control importante para regular su actividad.

La activación de los proenzimas se produce de manera secuencial, tal y como se muestra en la Figura 1.12.

La cisteína en el dominio del propéptido interacciona con el zinc manteniendo la latencia del enzima. La proMMP se activa en dos pasos; en un primer paso, un enzima proteolítico corta el propéptido (plasmina, calicreína, tripsina u otras MMPs) [351]. En un segundo paso se elimina el resto del propéptido por autocatálisis (o por otra MMP activa), confiriéndose actividad permanente a la MMP [353].

Las MMPs activadas pueden, a su vez, activar otras proMMPs, dando lugar así a mecanismos de retroalimentación positiva. Así por ejemplo, la MMP-3 y la MMP-10 pueden activar a las procólagenasas, generando colagenasas con una actividad específica de 5 a 12 veces mayor [354, 355]. La MMP-3, además de activar la proMMP-1 también es capaz de activar a la proMMP-9. Por lo tanto, la MMP-3 parece jugar un papel clave en la activación de la familia de las MMPs [356, 357].

La actividad de las MMPs en el espacio extracelular está controlada por un sistema de inhibidores que se divide, según su origen, en inhibidores serológicos e inhibidores tisulares (TIMPs) [358, 359]. Los TIMPs parecen ser los reguladores más importantes de las MMPs en los tejidos reproductivos de la mujer, ya que tienen una importante expresión tisular y se regulan hormonalmente [360-362].

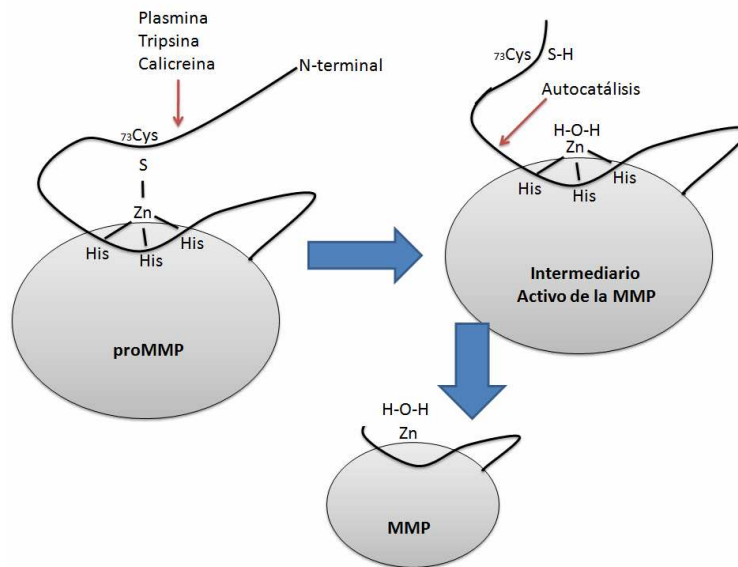


Figura 1. 12. Activación de las MMPs.

1. 3. 2. 5. Regulación hormonal y paracrina

Diversos autores han evaluado el papel de los esteroides ováricos como parte de estos mecanismos de regulación [363]. Es poco probable que los niveles fisiológicos de estrógeno afecten directamente a la actividad de las MMPs en tejidos del aparato reproductor femenino durante los periodos de crecimiento tisular [364-367]. Por el contrario, numerosos estudios *in vitro* han demostrado que concentraciones fisiológicas de progesterona producen una potente inhibición de la expresión proteica y de mRNA de diferentes MMPs, como la MMP-1, -2 y -9 [263, 368-371]. Sin embargo, la exposición y la subsiguiente caída brusca de los niveles de progesterona inducen la secreción y activación de ciertas MMPs [361, 372-374]. El único estudio *in vivo* que ha analizado estos cambios en la menstruación encontró que la expresión de la mayoría de MMPs disminuye tras la misma en ausencia de progesterona [367]. La expresión de la MMP-7 y el TIMP-1 pasa de la zona funcional a la basal tras la caída hormonal. Por lo tanto, es poco probable que la progesterona sea el único factor implicado en la regulación paracrina de las MMPs.

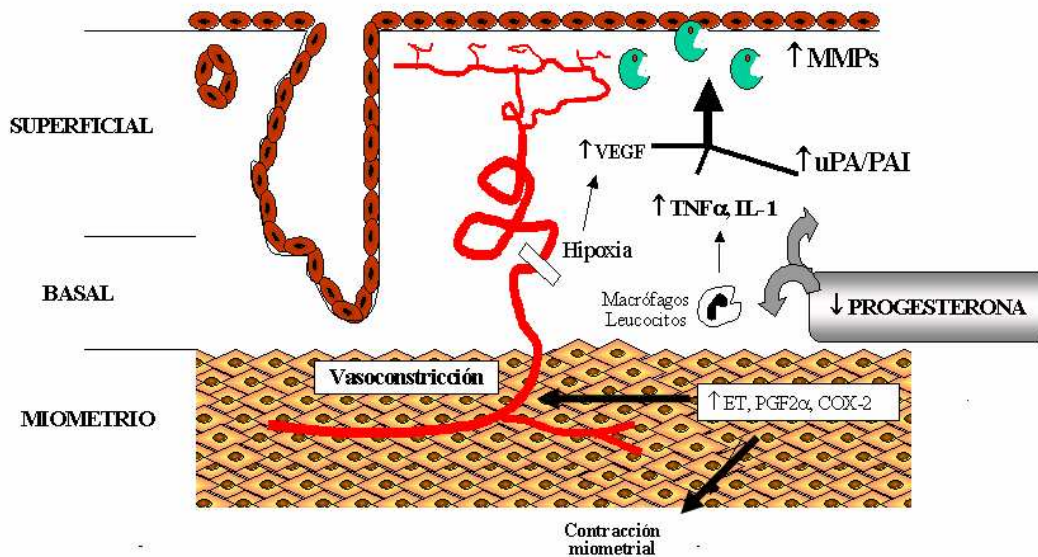


Figura 1. 13. Regulación paracrina de las MMPs en el endometrio. Existen diversos mecanismos implicados en el proceso de la menstruación. La hipoxia secundaria a vasoconstricción y la caída del nivel de progesterona estimula la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas. Éstas modulan la actividad de las proteasas, encargadas de degradar el sustrato superficial del endometrio (ET: endotelinas; PDGF-2 α : factor de crecimiento derivado de la plaqueta- α 2; COX-2: cicloxigenasa-2) (Modificado de Salamsen y col [375]).

Los niveles de las MMPs en el tejido endometrial también parecen estar regulados por los cambios de las poblaciones celulares locales [364, 376]. Así, durante la fase premenstrual el mayor número de células mieloides (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos) conlleva un aumento en la producción de citoquinas y proteasas [377]. También aumenta la activación de los mastocitos, que liberan potentes citoquinas, como la IL-1 y el TNF- α . Tanto la IL-1 como el TNF- α estimulan la producción de las proMMP-1 y -3 y, en menor medida, de la proMMP-2 [378, 379]. Se ha demostrado, en cultivos de endometrio humano, que diversas citoquinas pueden inducir la expresión selectiva de ciertas MMPs[371]. Tal y como se ha comentado previamente, el VEGF es un potente factor angiogénico presente en el endometrio humano que se ha implicado en la modulación de las MMPs [380]. Este factor estimula la expresión de MMP-1, -3 y -9 en células de músculo liso, y de MMP-1 en células endoteliales [381]. Además de existir citoquinas

que aumentan su actividad, se han encontrado factores supresores de la expresión de MMPs. Tal es el caso del TGF- β , del ácido retinoico y de los glucocorticoides [334, 382, 383].

1. 3. 3. POLIMORFISMO -1612 5A/6A DEL GEN DE LA MMP-3 EN LA ENDOMETRIOSIS (rs3025058)

Los polimorfismos genéticos localizados en la región promotora de los genes de las MMPs pueden dar lugar a un incremento o disminución de la expresión génica, pudiendo de esta forma estar asociados a la predisposición a sufrir distintas enfermedades.

Fisiológicamente, las MMPs regulan el remodelado tisular degradando los componentes estructurales de la MEC. Pero las MMPs también afectan a otras funciones celulares básicas, como la proliferación, diferenciación, motilidad, apoptosis, etc, al regular la interacción de las células con las proteínas de la MEC [384].

Las células endometriales estromales expresan varias MMPs, las cuales juegan un papel principal en la degradación de la MEC endometrial. La expresión alterada de esas proteasas puede llevar al establecimiento y progresión de la endometriosis. Es más, la supresión de la actividad de las MMPs inhibe la formación de lesiones ectópicas en ratones inmunodeprimidos “*nude*” [60]. Esto indica que la pérdida del control de la expresión de las MMPs puede permitir que los fragmentos endometriales lleguen al peritoneo e invadan su superficie, o la del tejido periférico.

La MMP-3 es un miembro clave de la familia de las MMPs, con una amplia especificidad de sustrato. Puede degradar a los colágenos tipo II, IV y IX, a los proteoglicanos, y a la laminina, fibronectina, gelatinas y elastina. Además, la MMP-3 también puede activar a otras MMPs como las colagenasas, la matrilisina y la gelatinasa B, por lo que la MMP-3 es crucial para el proceso de remodelación de tejido conectivo [342, 385].

Además, mientras que por un lado se ha observado variaciones en los niveles de MMP-3 en endometrio ectópico frente al endometrio eutópico de las mujeres con

endometriosis [61, 386], por otro lado el polimorfismo de inserción/delección de una adenina (5A/6A) en la posición -1612 de la región promotora del gen de la MMP-3 modifica la actividad transcripcional de forma específica de alelo, de forma que el alelo 5A está asociado con una mayor actividad transcripcional *in vitro*, aproximadamente el doble que el alelo 6A [387]. Este polimorfismo se ha asociado a enfermedades cardiovasculares [388, 389], formación de aneurisma de la aorta abdominal [390] y artritis reumatoide [391], así como a la susceptibilidad al cáncer de mama y a su capacidad invasiva [392].

La hipótesis de nuestro grupo es que este polimorfismo puede contribuir a incrementar la expresión de la MMP-3 en tejido endometrial y/o en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, facilitando la invasión y la posterior angiogénesis, necesaria para la supervivencia de las lesiones endometriósicas una vez adheridas.

Durante la realización de esta tesis se han publicado varios estudios relacionados con el polimorfismo de interés -1612 5A/6A, previamente conocido como -1171 5A/6A, ya que se secuenció a partir de un clon con una inversión [393], y su asociación con la endometriosis.

Shan y col [394], en población asiática, observaron que la frecuencia del alelo 2G del polimorfismo -1607 1G/2G del gen de la MMP-1, era mayor en mujeres con endometriosis que en controles. Además, este alelo 2G está asociado con una mayor actividad del promotor *in vitro* [395, 396], por lo que se asocia con una mayor producción proteica. Estos autores no observaron diferencias significativas con respecto al polimorfismo -1612 5A/6A del gen de la MMP-3 entre pacientes y controles, aunque había una mayor presencia, en el límite de la significación, del alelo 6A en las mujeres con endometriosis que en las controles. Como estos dos genes se encuentran en la misma región cromosómica (11q22.3) [397], separados por unas 37,64 kb, aunque no se encuentran en desequilibrio de ligamiento completo, estudiaron las combinaciones de los distintos alelos y observaron un mayor riesgo para las mujeres portadoras de los alelos -1607 2G (de la MMP-1) / -1612 6A (de la MMP-3).

Sin embargo, Ferrari y col [398], en población Italiana, no encontraron asociación de estos dos polimorfismos (-1607 1G/2G de la MMP-1 y -1612 5A/6A de la MMP-3) con una predisposición genética a sufrir endometriosis.

Por otro lado, Borghese y col [399], en poblaciones con distinto origen étnico, siendo la población caucásica la más abundante, examinaron la posible implicación de ocho polimorfismos de distintas MMPs (-1607 1G/2G de la MMP-1, -1575G/A y -1306C/T de la MMP-2, -1612 5A/6A de la MMP-3, -153C/T y -181A/G de la MMP-7, -82A/G de la MMP-12 y, finalmente, -77A/G de la MMP-13) y el riesgo de sufrir endometriosis. Todos estos genes se encuentran en la región cromosómica 11q21-q22 excepto el gen de la MMP-2, que se encuentra en 16q13-q21. El estudio también analizó la profundidad de penetración de la lesión endometriósica al comparar los distintos tipos de lesiones que se producen (superficiales, infiltrante profunda y ovárica) por separado. El estudio no encontró asociación entre el polimorfismo -1612 5A/6A de la MMP-3 con la endometriosis, ni siquiera al combinarse con el polimorfismo -1607 1G/2G de la MMP-1, como ocurría en el estudio de Shan y col [394], lo cual es consistente con el estudio de Ferrari y col [398].

1. 3. 4. INHIBIDORES TISULARES DE LAS METALOPROTEASAS (TIMPs)

1. 3. 4. 1. Estructura y biología de los TIMPs

Los inhibidores tisulares de las MMPs, los TIMPs, se producen localmente e inhiben específicamente las MMPs a nivel tisular. La familia de los TIMPs consta de cuatro miembros (TIMP 1 al 4) (Tabla 1.1). Todos ellos constan de dos dominios de pequeño tamaño: el dominio N-terminal de 125 aminoácidos y el C-terminal de 65 aminoácidos [359]. Cada uno de ellos está estabilizado por tres puentes disulfuro [400]. El dominio N-terminal es el responsable de la inhibición de las MMPs activas mientras que el dominio C-terminal modula la interacción entre los TIMPs y las proMMPs, que conlleva a la inactivación de los zimógenos [401].

Los TIMPs inhiben las MMPs con gran afinidad ($K_i \leq 10^{-9}$ M) mediante la formación de complejos de estequiometría 1:1. Los TIMPs inhiben con cierto grado de especificidad. Así, por ejemplo, el TIMP-1 se fija preferentemente a las colagenasas y las MMPs-3 y -9, mientras que el TIMP-2 tiene una alta afinidad por la MMP-2 [402]. Los TIMPs-1, -2 y -4 se secretan en forma soluble y difunden en el medio extracelular, mientras que el TIMP-3 está ligado a los constituyentes de la MEC, por lo que actúa impidiendo la fijación de las MMPs a su sustrato [403, 404].

1. 3. 4. 2. Regulación de los TIMPs

La expresión del TIMP-1 se estimula por diversos factores como el TGF- β [405], citoquinas y ésteres de forbol, mientras que la expresión de TIMP-2 es constitutiva [358].

La expresión de TIMP-3 se induce en respuesta a una estimulación mitógena y durante la progresión normal del ciclo celular, y es inhibida por TNF- α en los fibroblastos [406]. La expresión de TIMP-4 *in vivo* es muy abundante en el corazón [407] y en tejidos que han sido dañados, como una lesión vascular o dérmica [408, 409].

El promotor del gen del TIMP-1 no contiene la caja TATA. Sin embargo, posee una secuencia relacionada con ella a -20 pb del sitio de inicio de la transcripción [410]. Además, contiene diversas secuencias implicadas en la transcripción del gen, como los sitios de unión a AP-1, PEA3 y Sp1. La secuencia de unión a AP-1 (llamada TRE), situada en -92/-86 pb con respecto al punto de inicio de la transcripción, juega un papel esencial en la expresión basal e inducida del gen. La secuencia de unión a PEA3, situada a -78/-73 pb con respecto al punto de inicio de la transcripción, juega un papel menos relevante en la transcripción basal [410]. Sin embargo, se ha descrito que las proteínas AP-1, además de actuar sobre la secuencia TRE (-92/-86) podrían interactuar con la región de unión a PEA3 (-78/-73) potenciando la transcripción del gen [411]. El gen del TIMP-1 también contiene regiones represoras de su expresión, una de ellas situada en la posición -1718/-1458, y es capaz de reprimir la expresión del TIMP-1 hasta en un 50% [412].

Tabla 1. 1. Clasificación de los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs). Los TIMPs producen una inhibición específica de las MMPs a nivel tisular (CSC-21 K: cisteína-serina-cisteína 21K; MIG-5: gen 5 inducible por mitógeno) (Adaptado de Nagase [351] y Salomonsen y col [377]).

TIMP	Localización de la proteína ^a	MMPs que son sustrato
TIMP-1 (Xp11.23)	Epitelio, estroma, músculo liso vascular	Colagenasas (MMP-1, -8 y -13), Gelatinasas (MMP-2 y -9), Estrorelisinas (MMP-3, 10 y-11), Matrilisina 1 (MMP-7), MT3-MMP (MMP-16) y otras (MMP-12)
TIMP-2 (cromosoma 17)	Epitelio, estroma, músculo liso vascular	Colagenasas (MMP-1, -8 y -13), Gelatinasas (MMP-2 y -9), Estrorelisinas 1 y 2 (MMP-3 y 10), Matrilisina 1 (MMP-7), MT-MMPs (MMP-14, -15 y -16) y otras (MMP-19)
TIMP-3 (cromosoma 17)	Epitelio, estroma, músculo liso vascular	Colagenasas 1 y 3 (MMP-1 y -13), Gelatinasas (MMP-2 y -9), Estrorelisinas 1 (MMP-3), Matrilisina 1 (MMP-7), MT-MMPs (MMP-14, -15)
TIMP-4 (cromosoma 3)		Colagenasa 1 (MMP-1), Gelatinasas (MMP-2 y -9), Estrorelisinas 1 (MMP-3), Matrilisina 1 (MMP-7)

^a Datos de estudio de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

1. 3. 5. PAPEL DE LAS MMPs EN LA MENSTRUACIÓN

La menstruación es la culminación de los cambios en la arquitectura vascular y celular del endometrio que ocurren tras la caída de los esteroides sexuales. Al final de la fase secretora se produce un edema del estroma y una rotura de la membrana basal capilar secundaria a una disminución del contacto pericito-endotelial tras vasodilatación [413]. Al mismo tiempo, se produce un influjo de células inflamatorias que segregan numerosas citoquinas al medio extracelular [375]. A continuación, aumenta la liberación de agentes vasoconstrictores, como endotelinas y prostaglandinas, que estimulan a su vez la contractilidad miometrial. Como resultado de este proceso, el estrato funcional del endometrio sufre una necrosis que conlleva su fragmentación y liberación a la cavidad uterina [414-417].

Diversos estudios han implicado al sistema de las MMPs y sus inhibidores en el mecanismo íntimo por el que tienen lugar los procesos anteriormente descritos [418]. Mediante inmunohistoquímica [372, 419] e hibridación *in situ* [361, 373] se ha demostrado

la producción de MMP-1, -2, -3, -7 y -9, así como de TIMP-1 y -2, en el tejido endometrial. Estudios *in vivo* han demostrado la existencia de cambios cíclicos en la expresión de mRNA de diferentes MMPs (Figura 1. 17). Algunas MMPs, como las MMP-2, -7 y -11, se expresan en la fase proliferativa o secretora, mientras que otras como las MMP-1 y -3 aparecen principalmente en la fase menstrual y podrían estar implicadas directamente en el inicio de la menstruación [373]. Se ha constatado la expresión de TIMP-1 y -2 en las células estromales endometriales durante todo el ciclo menstrual. Dicha expresión aumenta, aunque en menor medida que las MMPs, los días 1 y 2 del ciclo. Dado que la inactivación de MMPs se produce mediante la formación de complejos 1:1 con los TIMPs, existe en ese periodo una tendencia a la proteólisis tisular, lo que podría facilitar la degradación del endometrio [420].

La mayor parte de las MMPs son producidas por las células del estroma durante la menstruación [361, 421]. Sin embargo, estudios *in vivo* e *in vitro* han constatado la capacidad de liberar MMPs por parte de las células endometriales epiteliales y estromales cultivadas por separado [372]. Mediante inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia de MMP-2, -3 y -9 en las estructuras vasculares endometriales [422]. Además, la expresión de la MMP-3 es mayor durante la fase premenstrual y menstrual a nivel de los vasos del estrato superficial endometrial, lo que le confiere un papel fundamental en el inicio de la menstruación. La expresión de la MMP-7 también aumenta durante la menstruación y es la única MMP que se expresa focalmente en el epitelio glandular, sin que hasta el momento se haya detectado a nivel estromal o vascular [419].

Los esteroides ováricos son necesarios en el funcionamiento de numerosos tejidos, como es el caso del endometrio [423, 424]. Los cultivos de células endometriales a los que se les retiran los esteroides, liberan importantes cantidades de MMPs que se activan rápidamente [263]. Experimentos *in vivo* muestran una expresión de MMP-11 al día siguiente de la deprivación hormonal, y de las MMPs -1, -3, -7 y -10 dos días después de la misma. Los niveles de las MMPs -1, -3 y -10 disminuyen considerablemente dos o tres días más tarde, mientras que los de las MMPs -7 y -11 se mantienen hasta seis días después de la caída de la concentración de progesterona, lo que reproduce exactamente el tipo de expresión observada en el ser humano.

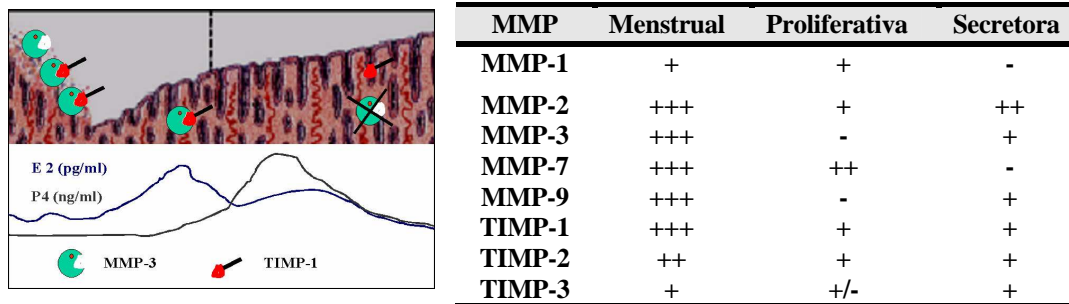


Figura 1. 14. Cambios cíclicos en las MMPs en el endometrio humano. El aumento de los niveles de MMP-3 durante la menstruación se localiza mediante inmunohistoquímica en los vasos de los estratos superficiales del endometrio, lo que indica que estas MMPs inician la degradación de la pared vascular durante la menstruación. La expresión de TIMP-1 en los vasos podría limitar el proceso proteolítico a los estratos superficiales del tejido endometrial, permitiendo una subsiguiente regeneración endometrial. (Freitas y col [422]).

La regeneración endometrial comienza el segundo día del inicio del sangrado menstrual [425]. La expresión heterogénea de TIMP-1 y -2 en las células musculares arteriolares y en el estroma durante la menstruación limita la acción de las MMPs en algunas zonas y preserva así la capacidad de regeneración endometrial [422]. En otras zonas, la persistencia de la actividad plasmínica y de las MMPs permite disolver la barrera de fibrina formada tras la descamación endometrial, favoreciendo así la migración celular y la regeneración a partir del estrato basal endometrial [426].

La angiogénesis es un proceso fundamental para la reparación endometrial [427]. El VEGF-A es el principal factor angiogénico endometrial, y está controlado por esteroides ováricos. Durante la menstruación se produce un incremento de su actividad que induce la expresión de MMPs e inhibe la actividad de los TIMPs en las células endoteliales [428]. Se ha demostrado que la acción de las MMP-2 y -9 es importante en las etapas iniciales de formación capilar [362]. La MMP-1, por su parte, es responsable de la migración celular endotelial por la MEC. Los niveles de TIMP-1, -2 y -3 permanecen bajos durante la fase proliferativa del ciclo menstrual y se expresan en respuesta al aumento de los niveles de progesterona [361, 429]. El aumento de TIMP-1, -2, -3 y, posiblemente, de TIMP-4, inhibe el proceso de neovascularización una vez se ha completado la regeneración tisular [430].

1. 3. 6. FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA DE LAS MMPs

Las MMPs juegan un papel importante en el recambio y la remodelación tisular. La regulación de estos procesos y, por lo tanto, de las MMPs, es necesaria para un gran número de procesos fisiológicos como son la embriogénesis, la reparación de tejidos dañados, el crecimiento óseo, la angiogénesis y la cicatrización [431, 432]. Una excesiva o inapropiada expresión de MMPs puede contribuir a numerosas patologías como la artritis, caries, esclerosis múltiple, osteoartritis, enfermedades vasculares, invasión tumoral y metástasis [433-439]. Por otro lado, se ha observado que ratones *knock-out* (KO) para una MMP determinada no presentan alteraciones en el desarrollo embrionario ni en la fertilidad [438], aunque estos ratones si que han mostrado evidencias directas de que las MMPs están implicadas en el crecimiento y la invasión tumoral. Así por ejemplo, ratones deficientes en MMP-7 muestran una disminución del tumor intestinal [440] y ratones deficientes en MMP-2 muestran una reducción en el crecimiento tumoral y en la reducción de metástasis en carcinomas de pulmón y en células de melanoma [441]. Además, estudios con inhibidores de las MMPs apoyan el papel de las MMPs en la progresión del tumor y la metástasis [336, 442].

Los TIMPs son proteínas multifuncionales cuya acción no se limita exclusivamente a la inhibición de las MMPs, sino que intervienen en la regulación de numerosos factores de crecimiento que determinan el desarrollo tisular [358]. Además, los TIMPs promueven el desarrollo embrionario [443], actúan como factores antiangiogénicos [335], estimulan el crecimiento celular [444] y modulan la apoptosis [445]. En cuanto a la función de los TIMPs en el crecimiento tumoral, parecen tener un papel doble [442]. Por un lado, se ha observado que su sobreexpresión en ciertas líneas celulares humanas y de roedores inhiben el crecimiento tumoral [446-449]. La presencia de TIMP-1 y TIMP-2 en células cancerosas se correlacionó con un menor comportamiento invasivo [450]. La sobreexpresión del TIMP-1 en ratones transgénicos inhibió el crecimiento del linfoma de las células T. Sin embargo, la metástasis en el hígado no se inhibió por niveles elevados de TIMP-1 [450], sugiriendo que no sólo las células tumorales sino también las células del estroma son necesarias para la progresión del tumor [442]. Por otro lado, la

deficiencia de TIMP-1 en el tumor o en las células del anfitrión potencia el crecimiento del tumor [451]. También se ha descrito que aparte de suprimir la neovascularización y la proteólisis, los TIMPs pueden promover la proliferación celular en algunos estados de la progresión del tumor [358]. Además, se ha encontrado una gran expresión de TIMP-1, 2 y 3 en diversos tumores malignos [452].

1. 3. 7. CAMBIOS DE LAS MMPs EN LA ENDOMETRIOSIS

Se cree que, al igual que en el cáncer, las MMPs promueven la invasión del tejido endometrial mediante la alteración de la estructura de la MEC, estimulando con ello la angiogénesis, aunque los productos de la acción proteolítica de ciertas MMPs pueden, por el contrario, inhibir la angiogénesis. En este sentido, se ha descrito que las MMPs -3, -7, -9 y -12, generan angiostatina, un inhibidor de la angiogénesis, a partir del plasminógeno [346, 453, 454].

1. 3. 7. 1. Lesiones endometriósicas y MMPs

Diversos estudios han demostrado una expresión anómala de los sistemas de las MMPs y los TIMPs en mujeres con endometriosis. Se ha identificado la expresión, en lesiones endometriósicas, de las MMPs -1, -2, -3 -7 y -9 y de TIMP-1 y -2 [61, 455-457]. La expresión de las distintas MMPs y TIMPs esta regulada por mecanismos hormonales y citoquinas y es específica según el tipo celular.

La progesterona activa la secreción de TGF- β por las células estromales endometriales, lo que conlleva a la inhibición de la producción de MMPs. Asimismo, las células estromales de mujeres con endometriosis poseen una mayor sensibilidad al estímulo por citoquinas y una menor expresión de MMPs en respuesta al estímulo esteroideo [458-460].

Las lesiones endometriósicas son estructural y bioquímicamente diferentes del endometrio normal. Su localización distal a la vascularización ovárica o uterina hace pensar que no reciben los mismos niveles de esteroides ováricos. Además, su contenido

en receptores esteroideos es más heterogéneo y poseen la capacidad de producir aromatasa, lo que les permite sintetizar estrógenos de forma autónoma [41, 461, 462]. El aumento en los implantes endometriósicos de la relación entre células epiteliales y estromales afecta a la producción de MMPs.

Tal y como se ha descrito previamente, la MMP-1 participa en la menstruación y su inhibición puede evitar el desencadenamiento de la misma [269]. Las lesiones endometriósicas activas, aquellas que presentan una importante vascularización y actividad proliferativa (lesiones rojas), expresan MMP-1. Sin embargo, esta MMP está ausente en las lesiones antiguas inactivas (lesiones negras y fibrosas), incluso durante la fase menstrual. Por lo tanto, la MMP-1 parece estar implicada en el inicio de la endometriosis y en la capacidad de los fragmentos endometriósicos para reimplantarse a distancia [455].

La MMP-2 ha sido estudiada mediante inmunohistoquímica en los implantes endometriósicos. Se ha demostrado una mayor expresión de la misma en el componente glandular de dichos implantes, aunque no se han encontrado diferencias a nivel endometrial [456]. Sin embargo, las pacientes con estadios avanzados de endometriosis presentan una mayor expresión de mRNA de MMP-2 y una disminución de los niveles de TIMP-2 en el endometrio uterino [457].

La secreción de MMP-3 también está alterada en el tejido endometriósico. Su expresión se encuentra aumentada en este tejido a lo largo de la fase secretora, hecho que puede ser revertido con la administración de danazol [463]. Al contrario que las MMP-1 y -7, que se producen focalmente a nivel estromal y epitelial respectivamente, la MMP-3 se expresa de manera más difusa en el tejido endometrial. Esta característica le confiere una importancia fundamental para la mejor comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad. La concentración de MMP-3 es muy alta en extractos de tejido endometrial de mujeres con endometriosis, mientras que las MMP-1, -2 y -9 se expresan en concentraciones menores [464]. Otros autores han identificado a la MMP-3 como una proteasa de secreción estromal cuya acción es predominante en el remodelado de la MEC del tejido endometriósico [465].

Estudios *in vivo* confieren a la IL-1 el papel de activador específico de esta proteasa en medios de cultivo [466]. Mientras que la expresión del mRNA de MMP-3 está disminuida durante la fase secretora en el endometrio normal, las mujeres con endometriosis la expresan en esta fase, tanto en el endometrio eutópico como en el tejido endometriósico [460]. Modelos de experimentación con roedores han detectado mRNA de MMP-3 en el tejido endometriósico, pero no en el endometrio eutópico. Dicha expresión se mantiene constante hasta cuatro semanas tras la exéresis quirúrgica de los implantes endometriósicos [467].

El endometrio humano expresa matrilisina, o MMP-7, solamente durante la fase proliferativa. Sin embargo, en el endometrio ectópico la expresión de esta metaloproteasa persiste durante todo el ciclo. Es la única MMP de síntesis exclusiva epitelial y su regulación depende de la acción de la progesterona sobre el componente estromal que se encuentra alterado, por otra parte, en los focos endometriósicos [382].

Se ha descrito la presencia de unos niveles de MMP-9 mayores en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis avanzada (estadios III-IV de la *AFSr*), en comparación con el endometrio de mujeres con o sin endometriosis [468]. Además, se ha descrito una disminución de los niveles de TIMP-3, tanto en el endometrio eutópico como en el tejido endometriósico de mujeres con endometriosis.

El TIMP-1, antes conocido como ENDO-II (*Endometriosis-Protein II*), se expresa de forma cíclica en el endometrio normal [361]. En el endometrio ectópico, su expresión a nivel estromal es evidente durante todo el ciclo [455]. Se ha aislado TIMP-1 en los focos de endometriosis, y se ha observado que su expresión es mayor después del tratamiento con danazol [463].

1. 3. 7. 2. Líquido peritoneal y MMPs

La hipótesis más aceptada para explicar la endometriosis consiste en el paso de restos de tejido endometrial a la cavidad peritoneal tras un proceso de menstruación retrógrada a través de las trompas. Sin embargo, la menstruación retrógrada se observa en la mayoría de las mujeres con ciclos menstruales y sólo algunas de ellas desarrollan

lesiones de endometriosis. Por lo que se ha postulado que deben existir factores del tejido endometrial o del ambiente peritoneal en esas mujeres que las hace más susceptibles de padecer esta enfermedad. Algunos investigadores han propuesto la existencia de defectos peritoneales microscópicos que facilitan el contacto de los fragmentos de tejido endometrial con la MEC subperitoneal y facilitan los procesos de proliferación e invasión de la misma [469].

El líquido peritoneal no actúa como un reservorio pasivo de las células y factores secretados a la cavidad peritoneal, sino que participa activamente en el mantenimiento del ambiente peritoneal. El volumen de este líquido es variable y proviene de dos fuentes fundamentales: el trasudado plasmático y el exudado ovárico [370, 470]. En la endometriosis existen cambios en el componente celular peritoneal asociados a un estado inflamatorio y de mayor inmunotolerancia, lo que impide la degradación de los fragmentos endometriales [471]. El aumento del número y la actividad de los macrófagos del líquido peritoneal en las mujeres con endometriosis conlleva un incremento en la síntesis de citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis y la proliferación de fibroblastos. De esta manera, se facilita la implantación de fragmentos endometriales y la formación de adherencias [65, 69, 472-474]. El líquido peritoneal de mujeres con endometriosis también contiene un número mayor de células NK y linfocitos T [475]. Sin embargo, la actividad citotóxica de las células NK contra el endometrio autólogo está disminuida, de forma que su destrucción en la cavidad peritoneal es menor que en mujeres sin endometriosis [71].

Estas modificaciones del ambiente peritoneal se traducen en una alteración del equilibrio del sistema de las MMPs y, consecuentemente, de la actividad proteolítica del líquido peritoneal. Los niveles totales de MMP-9 se encuentran aumentados en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis, mientras que la concentración de MMP-9 activada no varía [476]. Existen también variaciones de los niveles de inhibidores de las MMPs en el líquido peritoneal de estas pacientes [477]. Por una parte, estudios *in vitro* han demostrado que las lesiones peritoneales son capaces de sintetizar y secretar TIMP-1. Por el contrario, se ha detectado una reducción de los niveles proteicos de TIMP-1 en el

líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis [476, 478]. Una posible explicación a esta discrepancia es que el TIMP-1 podría estar localizado selectivamente en las lesiones endometriósicas o en las células del tejido peritoneal, con una reducción de la secreción del mismo al medio peritoneal. Por otra parte, el tratamiento con análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en estas pacientes, produce una recuperación de los niveles normales de TIMP-1 [476]. Además, la adición de TIMP-1 en la cavidad peritoneal parece prevenir el desarrollo de endometriosis en modelos de experimentación con roedores [60]. Estas diferencias sugieren que la concentración aberrante de TIMP-1 podría alterar el estado proteolítico de la cavidad peritoneal y contribuir a la formación de los implantes endometriales y las adherencias observados en la endometriosis. Sin embargo, no se han estudiado estos cambios en función del estadio de la enfermedad, de manera que podrían no reflejar realmente las alteraciones presentes en estadios más avanzados.

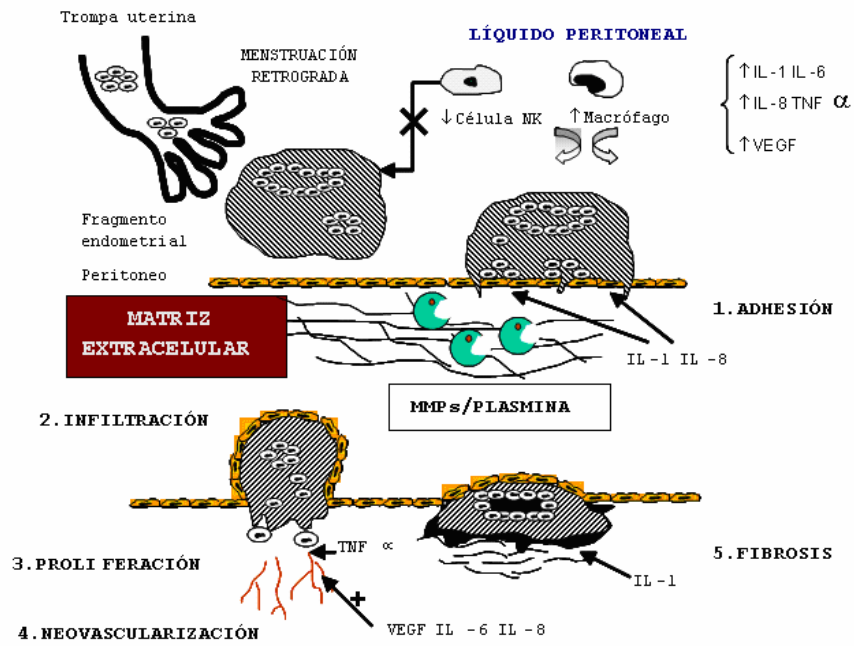


Figura 1. 15. Fisiopatología de la endometriosis: líquido peritoneal y MMPs. Se muestra el paso de restos de tejido endometrial con capacidad proteolítica a la cavidad peritoneal tras un proceso de menstruación retrógrada. Tras contactar con la superficie peritoneal se produce una invasión de la misma que lleva consigo un proceso de neovascularización, y finalmente da lugar a una lesión endometriósica (IL: interleuquina; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; célula NK: célula natural killer).

1. 4. ENDOMETRIOSIS Y ANGIOGÉNESIS

Según la teoría de la menstruación retrógrada, la endometriosis se produce por un proceso de implantación y crecimiento de las células endometriales sobre la superficie peritoneal y ovárica. Tal y como ocurre con los tumores, los implantes de células endometriales no son capaces de proliferar a menos que exista un proceso de neoangiogénesis, por lo que se cree que un aumento de la angiogénesis puede ser un factor importante en esta patología [479].

El proceso de angiogénesis implica la interacción de un elevado número de factores de crecimiento entre los que se encuentra el VEGF-A, el cual parece ser el principal factor angiogénico. Dentro de los inhibidores de la angiogénesis se encuentra la trombospondina-1 (TSP-1) [65, 480].

1. 4. 1. ASPECTOS GENERALES DE LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es el proceso de generación de nuevos capilares sanguíneos. Tiene lugar principalmente durante la embriogénesis, restringiéndose en el adulto a situaciones fisiológicas muy concretas y altamente reguladas, como los procesos reproductivos de la mujer y durante la reparación de heridas [481]. La neoangiogénesis es esencial para la reproducción normal, en concreto, para la maduración folicular, la ovulación, la formación y el funcionamiento normal del cuerpo lúteo, la implantación del embrión y el crecimiento y remodelado endometrial que se produce durante la menstruación [482, 483]. Durante estos procesos, la angiogénesis está mediada principalmente por el VEGF-A [484, 485]. La neovascularización también desempeña un papel fundamental en la cicatrización, regulada por factores de crecimiento, como el bFGF [486] y el VEGF-A [487]. Los macrófagos pueden contribuir al proceso de cicatrización por la liberación de estos factores angiogénicos [488].

Además, también se ha detectado la presencia de VEGF-A en zonas con células endoteliales quiescentes, tales como el corazón, el pulmón y el cerebro, lo que apunta el VEGF-A actúa como un factor de supervivencia.

La angiogénesis es un proceso complejo que implica la interacción entre las células, los factores solubles, y los componentes de la MEC. Entre estos factores el VEGF-A es reconocido como el principal factor angiogénico [480].

Se han descrito tres grupos de inductores de la angiogénesis [489]. El primer grupo está formado por la familia del VEGF y de las angiopoyetinas, que actúan específicamente en las células endoteliales. El segundo grupo incluye varias citoquinas, quimioquinas [490] y enzimas angiogénicos [491, 492], que activan una amplia gama de células diana además de las células endoteliales. El miembro prototipo de este grupo, el bFGF, fue uno de los primeros péptidos angiogénicos en caracterizarse. El tercer grupo de moléculas angiogénicas incluye los factores de acción indirecta, cuyo efecto sobre la angiogénesis se deriva de la liberación de factores de acción directa de los macrófagos, células endoteliales o células tumorales. Las moléculas más estudiadas son el TGF- β y el TNF- α , que inhiben la proliferación de células endoteliales *in vitro*. *In vivo*, el TGF- β induce la angiogénesis y estimula la expresión de TNF- α , bFGF, PDGF y VEGF-A por las células inflamatorias atraídas [493, 494]. El TNF- α aumenta la expresión de VEGF-A y sus receptores, IL-8 y bFGF en las células endoteliales, lo que explica sus propiedades angiogénicas *in vivo* [495, 496].

1. 4. 2. ACTIVADORES DE LA ANGIOGÉNESIS

En 1983, Senger y col [497] describieron la purificación parcial de una proteína capaz de inducir proliferación vascular. A esta proteína se la llamó factor de permeabilidad vascular (VPF) y se pensó que era un regulador específico de la permeabilidad de los vasos sanguíneos en tumores más que un factor de crecimiento. En 1989 Ferrara y Henzel [498] describen la purificación de un mitógeno específico para células endoteliales, a partir de células foliculares de la glándula pituitaria bovina, al que denominaron factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La proteína tenía una masa molecular aparente, calculada mediante SDS-PAGE, de 45 KDa en condiciones no reductoras y de 23 KDa en condiciones reductoras, lo que sugería la formación de

homodímeros. El clonaje y la expresión del VEGF y el VPF revelaron que estas dos moléculas eran en realidad la misma.

Con el tiempo se fueron identificando otros miembros de la familia del VEGF, el VEGF-B, -C, -D, -E y el factor de crecimiento placentario (PIGF), de forma que a la primera molécula descrita se le conoce como VEGF-A [499]. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener ocho cisteínas conservadas a lo largo de su secuencia, implicadas en la formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares, permitiendo estos últimos la formación de dímeros [500], con orientación antiparalela.

El PIGF-1 [501] posee una estructura tridimensional altamente similar a la del VEGF-A, aunque las dos proteínas sólo tienen un 42% de identidad en su secuencia, llegando a un 50% en el dominio de tipo PDGF.

1. 4. 2. 1. El factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo A (VEGF-A)

El gen del VEGF-A se localiza en la región cromosómica 6p12. Mattei y col [502] mapearon el VEGF-A, mediante hibridación in situ radiactiva, en 6p21-p12 y Wei y col [503] también localizaron el VEGF-A, mediante FISH, en 6p12.

Leung y col [504] clonaron el VEGF-A, realizando una búsqueda en una genoteca de cDNA de una línea celular de leucemia usando el VEGF-A bovino como sonda. La proteína deducida poseía un péptido señal de 26 aminoácidos en su extremo N-terminal y daba lugar a una proteína madura de 165 aa. También identificaron clones que codificaban isoformas del VEGF con 121 aa (delección de 44 aa en la posición 116) y con 189 aa (inserción de 24 aa en la posición 116).

El VEGF-A tiene homología con las cadenas A y B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A y PDGF-B), incluyendo la conservación de las 8 cisteínas encontradas en PDGFA y PDGFB. Además, el VEGF-A tiene 8 cisteínas adicionales en los 50 aa del extremo C-terminal.

codifica para 12 residuos básicos (arginina y lisina) de un total de 24, mientras que el exón 7 para 9 de un total de 44 [506]. Así, como el VEGF-A₁₂₁ no posee estas regiones ricas en aminoácidos básicos, no se une a heparina y difunde libremente, mientras que las isoformas más grandes, ricas en aminoácidos básicos, tienen una gran afinidad de unión a proteoglicanos de tipo heparán sulfato (heparina), con lo que se encuentran, principalmente, unidos en la superficie celular o secuestrados en la MEC [484, 510].

No obstante, tras la acción de diferentes enzimas como la heparinasa, la uroquinasa o la plasmina, se puede liberar un fragmento de 110 aminoácidos con actividad biológica. Por lo que en un principio se pensó que las isoformas largas del VEGF-A proporcionan un reservorio de factores de crecimiento disponible tras la acción de estas proteasas. Lo que indicaba que las diferentes isoformas del VEGF podrían estar biodisponibles mediante difusión libre o tras la acción de proteasas sobre las isoformas más grandes [495, 511, 512].

El VEGF se expresa en diferentes tejidos, incluyendo el cerebro, riñón, hígado, bazo y, además, en muchos tipos celulares [513]. *In vitro*, el VEGF-A estimula la degradación de la MEC, la proliferación y migración de las células endoteliales, la formación de capilares por estas células endoteliales y, además, induce en estas células la expresión de PAI-1, uPAR y MMP-1 [200, 514, 515]. *In vivo*, el VEGF-A regula la permeabilidad vascular, lo que es importante para la iniciación de la angiogénesis [516].

La pérdida de un alelo del gen VEGF-A conduce a la letalidad embrionaria, lo que implica que este factor desempeña un papel imprescindible en el desarrollo del sistema vascular [517]. Por otra parte, los homocigotos mutantes de pérdida de función de los dos receptores principales del VEGF-A, VEGFR-1 *-/-* y VEGFR-2 *-/-*, también conducen a la letalidad embrionaria, lo que implica que tanto el VEGF-A como sus dos receptores principales son esenciales para el desarrollo de la vasculatura embrionaria [518, 519].

1. 4. 2. 2. Regulación del VEGF-A

La transcripción del mRNA del VEGF-A se induce por distintos factores de crecimiento y citoquinas, incluyendo PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β y IL-1b [513] [520]

[521]. Por lo tanto, el VEGF-A puede funcionar como un mediador para los factores angiogénicos de acción indirecta.

La hipoxia es el regulador más importante de la angiogénesis, actúa principalmente induciendo la expresión de VEGF-A [522, 523] rápida y reversiblemente, aumentando la transcripción y la estabilización del mRNA [524]. De esta forma, el VEGF-A es capaz de estimular la elongación y ramificación de células endoteliales no proliferantes en cultivo con restricción de O₂ y nutrientes [525]. Por el contrario, la normoxia reprime la producción de VEGF-A e incluso produce la regresión de algunos vasos sanguíneos recién formados. Gracias a estos dos procesos opuestos, la vasculatura satisface las demandas metabólicas del tejido (o tumor) [526]. Además, la regulación de la expresión de los genes que codifican para los principales receptores del VEGF-A también están regulados por la hipoxia [527].

El VEGF media la actividad angiogénica en distintos tejidos diana dependientes de estrógeno. El estrógeno tiene un efecto transcripcional directo sobre la expresión génica del VEGF-A, a través de un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) situado a unas 1,5Kb en dirección 5' del punto de origen de la transcripción. La mutagénesis dirigida frente a este ERE evita la expresión de VEGF-A inducida por estrógenos [528].

1. 4. 2. 3. El factor de crecimiento placentario (PIGF)

El gen del PIGF se localiza en la región cromosómica 14q24.3 [502]. El gen del PIGF tiene 7 exones dispuestos a lo largo de unas 14 kilobases y las distintas isoformas, como en el caso del VEGF-A, se deben a splicing alternativo.

El PIGF fue originalmente identificado en la placenta [529], pero hay distintos tipos celulares que producen PIGF. Por un lado, las células endoteliales quiescentes liberan unas cantidades basales de PIGF pero, al activarse, producen elevadas cantidades de PIGF, regulando la activación angiogénica dependiente de VEGF-A. Por otro lado, otros tipos celulares como las células musculares lisas, células inflamatorias, células de la médula ósea, neuronas y muchos tipos de células tumorales, producen PIGF, especialmente cuando se activan o estresan [530].

El PlGF, al igual que el VEGF-A, también tiene distintas isoformas con diferente tamaño y propiedades de unión a la MEC [530].

El PlGF contribuye a la activación angiogénica mediante varios mecanismos: 1) amplificando la actividad angiogénica del VEGF-A en las células endoteliales, 2) actuando sobre las células musculares lisas, estimulando la maduración y estabilización de los vasos, 3) reclutando a células inflamatorias, que tienen un papel crítico en el crecimiento de vasos colaterales y 4) movilizándolo células madre/progenitores vasculares y hematopoyéticas de la médula ósea [530].

1. 4. 2. 4. Receptores de VEGF-A y PlGF

El VEGF-A y el PlGF constituyen una familia capaz de controlar la formación de vasos sanguíneos y su permeabilidad al interaccionar, principalmente, con dos receptores de tipo tirosina quinasa endoteliales, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1) [502]. Estos dos receptores están formados por 7 dominios de tipo inmunoglobulina extracelulares, una región transmembrana y un dominio de tipo tirosina quinasa citoplasmático, interrumpido por un dominio de inserción a quinasa [530].

La unión del VEGF-A con uno de estos receptores de tipo tirosina quinasa (VEGFR-1 y -2) desencadena la dimerización del receptor y su posterior autofosforilación. De esta forma, se transduce la señal, diferente en cada tipo de receptor [484]. La mayoría de las funciones biológicas iniciadas por VEGF-A se transmiten a través del VEGFR-2, pese a que el VEGFR-1 tiene una mayor afinidad por el VEGF-A. El PlGF se une específicamente al VEGFR-1, no al VEGFR-2, induciendo su autofosforilación [532, 533].

Mientras que el VEGFR-2 se localiza exclusivamente en las células endoteliales [534], el VEGFR-1, además de en las células endoteliales [535] también se encuentra en otras localizaciones como en células musculares lisas [536], células mesangiales intraglomerulares [537], monocitos [538], trofoblastos [539] y osteoblastos [540].

El PlGF, además de transducir su propia señal a través de su receptor, regula la comunicación intra- e intermolecular entre los receptores de tipo tirosina quinasa

VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1) [541]. El PIGF activa al VEGFR-1 produciendo una transfosforilación intermolecular del VEGFR-2, amplificando de esta forma la angiogénesis inducida por VEGF-A a través del VEGFR-2. Aunque tanto el VEGF-A como el PIGF son capaces de unirse al VEGFR-1, sólo el PIGF estimula la fosforilación de residuos de tirosina específicos en este receptor, activando la expresión de distintos genes diana. Es más, el heterodímero VEGF-A/PIGF, además de actuar directamente sobre el receptor homodimérico VEGFR-1 [530], puede inducir la formación de receptores heterodiméricos VEGFR-1/VEGFR-2, activando una comunicación intramolecular del receptor [541].

Por otra parte, el VEGFR-1 tiene una isoforma soluble, producida por splicing alternativo, que carece del séptimo dominio de tipo inmunoglobulina y de las regiones transmembrana y citoplasmática, pero que retiene su capacidad de unión al sus ligandos, con lo que actúa capturando las formas solubles de VEGF-A y PIGF [542].

1. 4. 3. POLIMORFISMOS -460C/T (rs833061), +405C/G (rs2010963) y 936C/T (rs3025039) DEL GEN DEL VEGF-A EN LA ENDOMETRIOSIS.

Se han descrito distintos polimorfismos en el gen del VEGF-A. Alguno de ellos -460C/T (rs833061), +405G/C (rs2010963) y 936C/T (rs3025039), se han asociado con la variación en la producción de proteínas [543, 544] y se han implicado con diversas enfermedades en las que está implicada la angiogénesis [545-547].

Distintos grupos han investigado la posible relación de estos polimorfismos con la endometriosis en distintas poblaciones. El polimorfismo -460C/T se ha estudiado en una población de mujeres chinas [548], el polimorfismo +405G/C en mujeres italianas [549], los polimorfismos -460C/T y +405G/C se estudian en mujeres del sur de la India [550], coreanas [551], y japonesas [552]. En este último grupo también se estudió el polimorfismo 936C/T. Existe gran controversia en los resultados obtenidos en los distintos estudios.

Aunque el grupo de Hsieh y col [548], en mujeres chinas, indica que la presencia del alelo -460T está asociado con una mayor susceptibilidad a sufrir endometriosis, el resto de grupos que estudió este polimorfismo [550-552] no encontró asociación entre este polimorfismo y la endometriosis. Además, mientras que las mujeres de la India con endometriosis mostraron una mayor frecuencia del alelo +405G [550], en los grupos de mujeres italianas [549] y coreanas [551] con endometriosis se encontró una mayor frecuencia del alelo +405C. Por otra parte, el estudio con mujeres japonesas no encontró diferencias entre las pacientes con endometriosis y el grupo control [552].

En cuanto al polimorfismo 936C/T se ha descrito una asociación positiva entre el alelo 936T del gen VEGF-A y la severidad de la enfermedad en población japonesa [552], aunque en mujeres coreanas con endometriosis no se encontraron diferencias [553].

En ninguno de estos estudios se investigó la influencia de esos tres polimorfismos funcionales del gen del VEGF-A sobre sus niveles de expresión, a nivel de mRNA y proteico, en tejido endometrial y a nivel proteico en líquido peritoneal.

La hipótesis de nuestro grupo es que estos polimorfismos pueden contribuir a incrementar la expresión del VEGF-A en tejido endometrial y/o en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, facilitando la supervivencia de las lesiones endometriósicas una vez adheridas.

1. 4. 4. INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS

1. 4. 4. 1. La trombospondina de tipo I (TSP-1)

Las trombospondinas son una familia formada por cinco productos génicos distintos, las TSP-1, -2, -3 y -4 y COMP (“cartilage oligomeric matrix protein”) [554].

La trombospondina de tipo I (TSP-1) es una glicoproteína trimérica, con subunidades de 180 KDa unidas mediante puentes disulfuro, que se secreta y se asocia a la MEC e inhibe la adhesión, migración, proliferación y formación de vasos de las células endoteliales,

actuando como un potente factor antiangiogénico [555]. De hecho, la inhibición de la actividad de la TSP-1 incrementa la angiogénesis *in vitro*.

La TSP-1 es una proteína multifuncional de la MEC. Se identificó inicialmente en los gránulos alfa de las plaquetas, pero más adelante se comprobó que se produce y secreta en distintos tipos celulares, como células endoteliales, fibroblastos, células de músculo liso y pneumocitos de tipo II [555, 556]. Se libera de las plaquetas tras su activación, teniendo un papel importante en la agregación plaquetar [557].

En un modelo de ratón KO para la TSP-1 se observó un leve incremento de la densidad vascular en distintos tejidos, lo que sugiere que, durante el desarrollo, la angiogénesis puede modularse sutilmente por estas proteínas [558]. En consecuencia, los ratones transgénicos que sobreexpresaban TSP-1 en la epidermis mostraban un retraso en la curación de heridas, caracterizado por una disminución en la vascularidad [559].

Curiosamente, aunque el modelo de ratón KO para la TSP-2 mostraba un gran incremento de la densidad vascular durante la curación de heridas [560-562], el KO doble para TSP-1 y TSP-2 producía una vasculatura normal durante la curación de heridas [563]. Una posible explicación es que tanto los ratones KO para la TSP-1 como los KO para la TSP-1/TSP-2 tenían un menor reclutamiento de macrófagos en el lecho vascular, los cuales son importantes durante las primeras etapas de la curación de heridas al proporcionar un estímulo angiogénico [555].

La compleja estructura de dominios de la TSP-1 le permite unirse a una enorme variedad de moléculas, entre las que se incluyen componentes de la MEC, receptores proteicos y glicolípidos de superficie celular, proteasas y factores de crecimiento/citoquinas [555], por lo que es complicado discernir la interacción (o interacciones) responsables del efecto antiangiogénico.

El dominio N-terminal de unión a heparina (HBD) de la TSP-1 se une a proteoglicanos de tipo heparán sulfato de la superficie celular, los cuales actúan como correceptores para la “proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad tipo 1” (LRP-1, LDL receptor-related protein 1). El LRP1 es un receptor

scavenger que elimina los complejos formados por la TSP-1 con la MMP-9 o el VEGF-A del ambiente pericelular de las células mesenquimales [564, 565]. La reducción de la actividad proteolítica tiene un efecto inhibitor en la angiogénesis [566] e influye en la estructura de la MEC [557]. El dominio N-terminal de la TSP-1 también interacciona con distintas integrinas que tienen diferentes efectos en la respuesta angiogénica.

Las repeticiones de tipo I median interacciones importantes de la TSP-1, entre las que se incluyen las interacciones con el complejo latente TGF- β 1, que es activado tras la interacción [558, 567], y con el CD36 [568, 569].

Las repeticiones de tipo II y III parecen ser las responsables de la adhesión de las TSPs a las células endoteliales, una propiedad que se ha atribuido principalmente a la secuencia RGD presente en la última repetición de tipo III de unión a Ca^{2+} . Sin embargo, otros autores [570] no han podido confirmar estos hallazgos y sugieren que el principal mecanismo de unión de la TSP-1 con la superficie de las células endoteliales se debe a la interacción del dominio N-terminal de la TSP-1 con las integrinas β 1 de la superficie celular. Las repeticiones de tipo III de la TSP-1 también parece ser el punto de unión con el bFGF [571], previamente identificado en las repeticiones de tipo I [572]. La TSP-1 evita la unión del bFGF libre a la MEC y además promueve la movilización del bFGF unido a la membrana. Así, consigue formar un complejo bFGF:TSP-1 con una menor capacidad de inducir proliferación en las células endoteliales [573]. Como en el caso del bFGF, la TSP-1 también es capaz de unirse al VEGF-A [574] y al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) [575] unidos a la MEC, formar un complejo con ellos y movilizarlos. De esta forma, la TSP-1 puede actuar como un scavenger para los factores angiogénicos asociados a la MEC, modificando su localización y función.

La TSP-1 interacciona con distintas serin proteasas y MMPs, de forma que pueden regular la angiogénesis mediada por proteasas, como la degradación de la membrana basal, la movilización de factores de crecimiento y la liberación de fragmentos críticos de moléculas de la MEC.

La interacción mejor caracterizada es con CD36, una proteína de membrana perteneciente a la familia de receptores *scavenger* de tipo B [576], localizada en las células endoteliales [568]. CD36 inhibe las señales proangiogénicas inducidas por factores de crecimiento que median proliferación de células endoteliales, migración y formación de vasos y genera señales antiangiogénicas que llevan a la apoptosis [568, 569]. La interacción de la TSP-1 con CD36 tiene un efecto antiangiogénico. De hecho, el uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes frente a CD36 bloquea la habilidad de la TSP-1 para inhibir la angiogénesis, de forma que CD36 media, al menos una gran parte, de la actividad antiangiogénica de la TSP-1 [568]. Mientras que otros ligandos de CD36 mimetizan los efectos de la TSP-1. Además, ratones KO para CD36 son refractarios a los efectos inhibidores de la TSP-1 [569].

La glicoproteína rica en histidina (HRGP) es capaz de regular a la TSP-1, al interactuar con ella por el mismo sitio de unión que CD36 [577], evitando así la unión de la TSP-1 con CD36. De esta forma es posible que la actividad de la TSP-1 mediada por CD36 se pueda atenuar por proteínas plasmáticas, por ejemplo en situaciones en las que hay liberación de plasma, como en heridas o en tumores [555].

1. 4. 5. FISIOPATOLOGÍA DE LA ANGIOGÉNESIS

La pérdida de la regulación de la angiogénesis puede dar lugar a diversas patologías como la artritis reumatoide, retinopatía diabética, psoriasis y hemangiomas juveniles [524, 578]. Además, el crecimiento tumoral y la metástasis son altamente dependientes de la angiogénesis, ya que un tumor en crecimiento necesita una extensa red de capilares para proveerse de alimentos y oxígeno y, además, los nuevos vasos sanguíneos intratumorales proporcionan la vía de entrada a circulación sanguínea, lo que permite a las células tumorales entrar en circulación y metastatizar a órganos distantes [524].

En concreto, el VEGF-A desempeña un papel fundamental en varios cánceres humanos, en la retinopatía diabética, en la artritis reumatoide y en la aterosclerosis [484].

También contribuye a la formación de vasos sanguíneos en el tumor y promueve su supervivencia [525], estando implicado de esta forma en el crecimiento tumoral. Se ha observado que, en el cáncer de tiroides, la elevada expresión del VEGF-A es un mal pronóstico, ya que además de permitir el crecimiento tumoral incrementa el riesgo de metástasis [579].

Las mujeres embarazadas que desarrollan preeclampsia presentan niveles incrementados de sVEGFR-1 y disminuidos de VEGF-A y PIGF libres [580], lo que priva al endotelio de las señales de mantenimiento y supervivencia que generan estos factores de crecimiento. Como consecuencia de ello se pueden producir edemas y aumento de la presión sanguínea, ya que el VEGF-A es un vasodilatador.

1. 4. 6. CAMBIOS DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA ENDOMETRIOSIS

El endometrio sufre cambios de crecimiento y regresión durante el ciclo menstrual que dependen de los niveles de las hormonas esteroideas y es una fuente de factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo el VEGF-A, el cual induce proliferación de células endoteliales, migración, diferenciación y formación de capilares [581].

Se ha demostrado que el crecimiento del endometrio durante el ciclo menstrual está íntimamente ligado al crecimiento y maduración de la vasculatura. De hecho, el bloqueo de la angiogénesis reduce o restringe la proliferación del endometrio [582].

Diversos estudios indican que la angiogénesis está implicada en la endometriosis, observándose un incremento en los niveles de VEGF-A en la endometriosis y sugiriéndose que también juega un papel importante en la progresión de la enfermedad [10, 65, 473, 583-587].

Se ha observado expresión de mRNA de PIGF en células NK uterinas [588] y también se ha descrito un incremento en los niveles proteicos de PIGF en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis frente al de mujeres con adenomas quísticos [589], lo que nos indica que el PIGF puede tener algún papel concreto en la

endometriosis. Pese a que el PIGF es conocido por intensificar la actividad del VEGF-A, no hay estudios previos de expresión de PIGF en tejidos de pacientes afectadas de endometriosis, por ello nos decidimos a estudiar su expresión en muestras de tejido endometrial y en líquido peritoneal.

Se ha descrito que la TSP-1 se expresa en el endometrio [556, 590], y alteraciones en la expresión de TSP-1 podrían contribuir a ciertas anormalidades del ciclo menstrual de la mujer [590]. Aunque Tan y col. [585] estudiaron la expresión de mRNA de VEGF y TSP-1 en la endometriosis, no se han descrito los niveles proteicos de TSP-1 en líquido peritoneal y extractos de tejido en la endometriosis, por ello también nos decidimos a estudiar su expresión. La angiogénesis depende de las interacciones controladas entre células y MEC, y una proteólisis extracelular controlada es un requerimiento para la formación de nuevos vasos. La mayoría de los enzimas extracelulares relevantes pertenecen a los sistemas fibrinolítico y de las MMPs [591]. Se ha estudiado el papel de estos dos sistemas en la endometriosis [8, 14, 94, 95, 467, 468, 592, 593]. Nuestro grupo ha descrito niveles incrementados de uPA y MMP-3 en endometrio de mujeres con endometriosis [14, 95], sugiriendo que este incremento puede contribuir al potencial invasivo de las células endometriales.

Aunque varios estudios indican que la angiogénesis es importante en la patología de la endometriosis, no se ha descrito la evaluación simultánea de factores angiogénicos y antiangiogénicos y su relación con componentes de los sistemas fibrinolítico y de las MMPs en la endometriosis, por ello nos decidimos a evaluar estos parámetros en conjunto.

1. 5. INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO Y DE LAS METALOPROTEASAS CON LA ANGIOGÉNESIS

Para iniciar la formación de nuevos capilares, las células endoteliales de los vasos sanguíneos preexistentes deben degradar la membrana basal subyacente e invadir el estroma del tejido vecino [594]. Estos procesos de invasión y de migración de las células endoteliales requieren de la cooperación de los sistemas de activación del plasminógeno y de las MMPs.

Los activadores fibrinolíticos, uPA y tPA, son serin proteasas que convierten el plasminógeno en plasmina. La actividad fibrinolítica en la sangre se regula principalmente por el tPA, mientras que la activación de plasminógeno en tejido es regulada por la uPA [524, 594]. La interacción de la uPA con su receptor puede, por un lado, concentrar la actividad enzimática en los llamados “sitios focales de acoplamiento”, localizados en la superficie celular y, por otro, inducir la migración y la invasión de la célula [595].

La plasmina tiene amplia especificidad de sustrato y degrada varios componentes de la MEC, incluyendo fibrina, fibronectina, vitronectina, laminina, y el core proteico de los proteoglicanos [524, 594], siendo incapaz de degradar otros componentes importantes de la MEC como el colágeno y la elastina, degradados por las MMPs. Además de degradar directamente diversos componentes de la MEC, la plasmina es capaz de activar varias proMMPs como la proMMP-1, -3, -9, -10 y -13 [354-356, 596-598]. La plasmina también posee una acción proteolítica sobre los TIMPs [599]. Así pues, la plasmina contribuye a la acción proteolítica de las MMPs mediante su activación, la facilitación de su acceso al colágeno (tras la degradación de diversas glicoproteínas de la MEC) [107] y la degradación de sus inhibidores (Figura 1.17). Las MMPs activadas pueden, a su vez, activar otras proMMPs, dando lugar así a mecanismos de retroalimentación positiva.

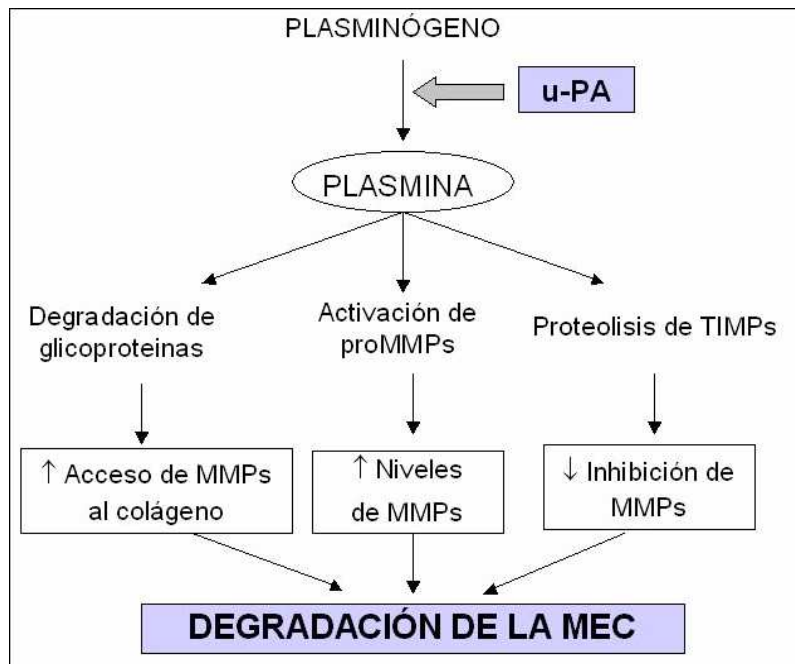


Figura 1. 17. Interrelación entre el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas matriciales (MMPs). La plasmína ejerce su acción proteolítica sobre la MEC tras su activación por la uPA, de forma directa o indirectamente al aumentar los niveles de MMPs, facilitando así su acceso al colágeno de la MEC. uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; TIMPs: inhibidores tisulares de las MMPs; MEC: matriz extracelular (Mignatti y Rifkin [600]).

Las MMP-3, -7, -9 y -12 pueden convertir el plasminógeno, por hidrólisis de los cuatro kringles del extremo aminoterminal, en angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis. Estudios “*in vivo*” han demostrado que la angiostatina es capaz de inducir la apoptosis en células endoteliales, pudiendo ser éste el mecanismo de su efecto antiangiogénico [601]. También se han descrito fragmentos derivados de las trombospondinas, producidos por acción proteolítica, los cuales presentan mayor actividad antiangiogénica que la molécula completa [602].

Además, las MMP-3 y -7 son capaces de convertir a la sc-uPA en una forma de menor masa molecular [603]. La MMP-3 también hidroliza específicamente a la uPA produciendo un fragmento amino terminal de 17 KDa, que contiene intacta la secuencia de unión al receptor, y un fragmento carboxiterminal de 32 KDa que contiene el dominio

serin-proteasa. Por lo tanto, la MMP-3 es capaz de eliminar la parte N-terminal del uPA, a través de la cual se une al uPAR, sin alterar sus propiedades enzimáticas [604]. Todo ello sugiere una doble función de la uPA. Por una parte activa a la proMMP-3 a través de la generación de plasmina. Por otra parte, una vez proteolizada por la MMP-3, la uPA sin el dominio N-terminal no puede unirse a su receptor. Por lo tanto, la interacción uPA/MMP-3 puede tener un papel en la regulación de las células con una actividad asociada a uPA y puede representar el mecanismo por el cual son controladas las funciones de uPAR dependientes e independientes de uPA.

La MMP-3 también interacciona específicamente con inhibidores del sistema fibrinolítico. Así, es capaz de degradar la α_2 -antiplasmina, evitando la formación de complejos con plasmina y con plasminógeno y, por tanto, su inactivación. Además, la MMP-3 es capaz de degradar el PAI-1, tanto libre como unido a vitronectina, dando lugar a un PAI-1 inactivo e incapaz de unirse a la vitronectina. Así pues, la inactivación de PAI-1 por la MMP-3 puede constituir un mecanismo de disminución de la actividad inhibitoria del PAI-1 y, por lo tanto, de la migración y la adhesión celular mediado por el PAI-1 unido a vitronectina [599].

Por otro lado, aunque tanto la uPA como las MMPs tienen sus respectivos inhibidores (PAIs y TIMPs), el nivel de integración de ambos sistemas llega a tal punto que cambios en la expresión del PAI-1 determinan cambios de actividad de las MMPs, dependientes de su activación a través del sistema fibrinolítico e independientes de los niveles de TIMPs [374]. De esta forma, los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas cooperan en la degradación de la MEC [605, 606]. Esta degradación permite que las células endoteliales “líder” comiencen a migrar a través de la MEC degradada. Estas células son seguidas por células endoteliales proliferantes, que son estimuladas por distintos factores de crecimiento, algunos de los cuales se liberan de la MEC degradada.

Como muchos otros factores de crecimiento, el VEGF-A se une a las moléculas de la MEC. Esta interacción se regula por “splicing” alternativo, que genera una gran variedad de isoformas del VEGF-A con distintas afinidades para proteínas específicas de la MEC. Además, la interacción del VEGF-A con la MEC también puede alterarse post-

traduccionalmente por procesamiento proteolítico. De hecho, todas las isoformas del VEGF-A (incluyendo VEGF-A₁₂₁) pueden ser escindidas por la plasmina tras el aminoácido 110 y por distintas MMPs, incluyendo las MMP-3, -7 y -9 (en presencia de heparina) y la MMP-19, tras el aminoácido 113, liberando el fragmento bioactivo del factor de crecimiento (dominio de unión al receptor) del sitio de anclaje a la MEC [607].

Aunque tanto las formas unidas a la MEC como las solubles (escindidas o no) pueden inducir la fosforilación en los dos receptores principales (VEGFR-1 y -2), parece ser que el VEGF-A unido a la MEC y el VEGF-A soluble dan lugar a distintos tipos de señalización. Por ejemplo, el anclaje a la MEC lleva a la agrupación del VEGFR-2 y aumenta la internalización del receptor y su cinética de fosforilación, lo que contribuye a distinguir las respuestas endoteliales [608]. De hecho, estas diferencias entre VEGF-A soluble y unido a la MEC dan lugar a diferentes formas de expansión vascular. Mediante el uso de formas de VEGF-A modificadas se ha observado que una versión que imita a VEGF-A de 113 aa soluble produce lechos vasculares con baja densidad vascular y ramificación pobre. En contraste, un VEGF-A mutante unido a la MEC y resistente al corte producido por la plasmina o las MMPs, induce la formación de vasos muy delgados y con una ramificación abundante, que facilitará la perfusión tisular y el crecimiento tumoral [607]. Así, el VEGF-A soluble induce hiperplasia vascular, mientras que el VEGF-A unido a la MEC induce la formación de nuevos vasos.

Así, estos eventos proteolíticos pueden modular los niveles de VEGF-A soluble y VEGF-A unido a la MEC en los tejidos y, de esta forma, producir tanto elongación como ramificación por formación de nuevos vasos. De esta manera, el número de células inflamatorias puede modular la unión del VEGF-A a la MEC, regulando la actividad de estos factores de crecimiento.

La interrelación existente a nivel endometrial entre la angiogénesis y los sistemas fibrinolítico y de las MMPs hace necesario su estudio conjunto en situaciones patológicas, como es el caso de la endometriosis.

2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

“No hay nada que limite más la innovación que una visión dogmática del mundo”.

Stephen Jay Gould.

Hipótesis

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna de etiología desconocida, en la que tiene lugar una proteólisis local extracelular, semejante a la que se produce en los procesos malignos, y que puede llevar a un proceso de degradación de la matriz extracelular del peritoneo o del ovario, lo que determina la implantación del tejido en localizaciones ectópicas. Por otra parte, existe una formación de nuevos vasos en el lugar de implantación, lo que conlleva la formación de la lesión endometriósica inicial. Diversos factores se han implicado como causa de endometriosis, incluyendo alteraciones del sistema inmunológico, de la angiogénesis, del ambiente peritoneal, predisposición genética y alteraciones endometriales. Esta multifactorial y multicompartimental patogenia, unida a la heterogeneidad clínica, ha creado una confusión de datos que limita el consenso de un mecanismo unificado.

Previamente a este estudio, nuestro grupo confirmó la existencia de alteraciones de la expresión tisular de diversos componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas en la endometriosis a nivel proteico [14]. Además, como la relación entre niveles de proteína y cantidad de mRNA es un elemento fundamental para entender los cambios de la expresión génica, nos decidimos a utilizar la técnica de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real para cuantificar los niveles de mRNA de estos componentes del sistema fibrinolítico, de las MMPs y de la angiogénesis en la endometriosis. Con este proyecto se amplía el número de pacientes y se estudia, a nivel de mRNA y proteico, diversos factores del sistema fibrinolítico de las metaloproteasas y, además, diversos factores implicados en la angiogénesis. Nuestra hipótesis es que hay una expresión alterada de estos componentes en la endometriosis y que algunos polimorfismos pueden influir en dicha expresión.

Por todo ello consideramos importante valorar la expresión mRNA y proteica de los componentes de estos sistemas en la endometriosis con el fin de delimitar el papel de los mismos en la patogenia de esta enfermedad ginecológica de gran prevalencia y su posible implicación en el proceso de proliferación, adhesión y lisis celular.

Por último, también hipotetizamos con la posibilidad de que el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis puede modificar la expresión de diversos componentes de estos sistemas proteolíticos y de la angiogénesis en los fragmentos endometriales, favoreciendo la implantación y la angiogénesis.

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

Objetivos

Los objetivos planteados son los siguientes:

1.- Puesta a punto de la técnica de RT-PCR cuantitativo en tiempo real para la determinación de mRNA de los distintos factores relacionados con el sistema fibrinolítico (uPA, PAI-1) sistema de las metaloproteasas (MMP-3 y TIMP-1) y angiogénesis (VEGF-A, PlGF y TSP) en endometrio ectópico y eutópico de mujeres con endometriosis y endometrio control.

2.- Analizar los niveles antigénicos de diversos componentes del sistema fibrinolítico (uPA, PAI-1), del sistema de las MMPs (MMP-3 y TIMP-1) y de factores angiogénicos (VEGF-A, PlGF, TSP), tanto en tejido como en líquido peritoneal. Con estos datos se obtendrá el estado proteolítico y angiogénico tisular y peritoneal, lo que nos permitirá analizar el posible papel de la proteólisis y la angiogénesis en el proceso de implantación y progresión de los fragmentos endometriales tras un proceso de menstruación retrógrada.

3.- Estudiar la variación de los componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas y angiogénesis en función del estadio de la enfermedad.

4.- Correlacionar los factores angiogénicos con los componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas (uPA, PAI-1, MMP-3 y TIMP-1) en endometrio ectópico y eutópico de mujeres con endometriosis y endometrio control.

5.- Analizar el polimorfismo 4G/5G de la región promotora del gen del PAI-1, el polimorfismo 5A/6A de la MMP-3 Y los polimorfismos -460C/T , +405G/C, y 936C/T del gen del VEGF-A y su influencia sobre la expresión tisular de dichos componentes en la endometriosis. Identificar el valor de estos polimorfismos como marcadores de enfermedad.

6.- Estudiar en un modelo *in vitro* de cultivos primarios de células estromales procedentes de mujeres con o sin endometriosis para valorar la influencia del líquido peritoneal normal y patológico sobre diversos componentes del sistema fibrinolítico y de la angiogénesis.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

“Para investigar la verdad es preciso dudar, en cuanto sea posible, de todas las cosas, una vez en la vida”.

Rene Descartes

3. 1. GRUPOS CLÍNICOS

Las mujeres incluidas en este estudio se reclutaron en los servicios de ginecología del Hospital Arnau de Vilanova y en el Hospital Universitario La Fe de Valencia. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado, siendo todas las pacientes mayores de edad y todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki [609].

El diagnóstico de la endometriosis se realizó mediante la valoración macroscópica sistemática durante una cirugía por vía laparoscópica de toda la anatomía genital y del resto de la cavidad abdominal. Se analizaron exhaustivamente las características del quiste aneural y su contenido en los casos en los que estaba presente. Se realizó una búsqueda minuciosa de implantes peritoneales, lesiones atípicas, defectos peritoneales o adherencias para realizar un correcto estadiaje de la enfermedad, realizando una biopsia de cualquier zona sospechosa de enfermedad. Posteriormente se comprobó en todos los casos, mediante examen anatomopatológico, la presencia de glándulas endometriales y estroma en las muestras extraídas. Las mujeres con sospecha de endometriosis pero sin confirmación anatomopatológica de la enfermedad se excluyeron del estudio.

El grupo total de pacientes estaba formado por 186 mujeres diagnosticadas de endometriosis (167 mujeres con endometriosis moderada o severa, estadios III-IV y 19 mujeres con endometriosis leve, estadios I-II, siguiendo la clasificación según la clasificación revisada de la *American Fertility Society* [610], con una edad media: 32.9 años; rango 18-53.

El grupo control de mujeres sin endometriosis lo formaron 220 mujeres sin endometriosis (edad media 34.2 años; rango 17-53). Las indicaciones quirúrgicas incluyeron dolor pélvico (3,6 %), esterilidad (14,6 %) o esterilización tubárica (81,8 %). Para detectar la presencia de lesiones sospechosas de endometriosis se realizó un examen minucioso del peritoneo, ovarios, intestino y diafragma. Las biopsias sospechosas de endometriosis fueron negativas en las mujeres incluidas en el grupo control.

Las mujeres con menorragia, hipermenorrea o que habían estado embarazadas o en periodo de lactancia en los 6 meses previos se excluyeron del estudio. Ninguna mujer había recibido tratamiento hormonal al menos 3 meses antes del estudio.

3. 2. MUESTRAS

3. 2. 1. MUESTRAS DE SANGRE

La extracción de sangre se realizó por punción en la vena cubital y se anticoaguló con EDTA para obtener posteriormente el DNA en 186 pacientes diagnosticadas de endometriosis y 220 controles.

3. 2. 2. MUESTRAS DE TEJIDO ENDOMETRIAL Y ENDOMETRIÓSICO

Las muestras de endometrioma ovárico se obtuvieron de la cápsula del endometrioma en 71 pacientes con endometriosis (estadios III-IV). En la mayoría de los casos la técnica quirúrgica laparoscópica permitió realizar una quistectomía siguiendo el plano de disección entre el endometrioma y el parénquima ovárico sano, por lo que se tomó una muestra significativa del endometrioma ovárico. En los casos en que se realizó una anexectomía que incluía el endometrioma, el tejido ovárico adyacente fue separado de forma macroscópica mediante bisturí frío inmediatamente tras la intervención.

Se remitió un fragmento de este tejido endometriósico al laboratorio de anatomía patológica para confirmar, mediante examen histológico, la presencia de endometriosis mediante la identificación de glándulas y estroma endometrial.

En 54 de las pacientes con endometriosis se obtuvo también una biopsia de tejido endometrial (endometrio eutópico) en el transcurso de un procedimiento quirúrgico, bajo anestesia general, mediante una cánula de aspiración endometrial. En 40 de estas pacientes se evaluaron los distintos parámetros estudiados en muestras pareadas de tejido endometrial y tejido de endometrioma ovárico. Las 14 muestras restantes se utilizaron para realizar cultivos de células estromales endometriales.

Adicionalmente se obtuvieron muestras de implantes peritoneales activos y de endometrio eutópico en 13 mujeres con endometriosis mínima-leve (estadios I-II), mediante la sección en frío del implante macroscópico con mínima manipulación del mismo durante el procedimiento quirúrgico. Se incluyeron lesiones rojas con aspecto

macroscópico activo, descartándose las lesiones antiguas o atípicas, con el objeto de analizar las características de la lesión inicial en enfermas con estadios precoces de la enfermedad.

En 56 mujeres sin endometriosis se obtuvo muestra de tejido endometrial por el mismo procedimiento (endometrio control). 50 muestras de endometrio control se evaluaron los distintos parámetros estudiados y en 6 muestras se utilizaron para realizar cultivos de células estromales endometriales.

3. 2. 3. MUESTRAS DE LÍQUIDO PERITONEAL

Además de las muestras de tejido, se obtuvo líquido peritoneal de las pacientes (n=66) y controles (n=35), cuando existía un volumen significativo de líquido en la pelvis menor.

Tras acceso laparoscópico a la cavidad peritoneal mediante un sistema de trócares, se procedió a separar el paquete intestinal para visualizar correctamente la pelvis menor e identificar la presencia de líquido peritoneal. Las muestras de trasudado peritoneal se recogieron cuidadosamente del fondo de saco de Douglas y del espacio vesicouterino, tal y como se describe en estudios previos [611]. Se realizó una aspiración del mismo con un sistema cerrado con una cánula laparoscópica conectada a una jeringa estéril. Se desecharon las muestras en las que se evidenció contaminación macroscópica del trasudado peritoneal con restos hemáticos durante el acceso quirúrgico. No se realizaron lavados peritoneales previamente a la recolección de las muestras ni tampoco se utilizó anticoagulante. El procedimiento utilizado fue similar para los dos grupos de pacientes estudiados.

Para los experimentos de cultivos de células endometriales tratados con líquido peritoneal se utilizaron 10 muestras de líquido peritoneal de pacientes (*pool* de endometriosis) y otras 10 muestras de controles (*pool* control).

3. 2. 4. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre se mantuvieron a 4 °C hasta la extracción de DNA.

Las muestras de tejido endometrial y endometriósico se lavaron en tampón fosfato salino, pH 7,4 (PBS) y guardaron en nevera hasta el final del procedimiento quirúrgico. Una parte de la muestra fue rápidamente congelada en nitrógeno líquido donde permaneció hasta que se realizó la extracción de proteínas o de RNA. Otra parte se fijó durante toda la noche en paraformaldehído a 4 °C y se embebió en bloques de parafina. Posteriormente se realizaron cortes del tejido endometrial para comprobar, mediante microscopía óptica, la fase del ciclo menstrual y del tejido endometriósico para el diagnóstico, mediante la presencia de glándulas y estroma.

Además, se utilizaron algunas muestras de tejido endometrial para realizar estudio *in vitro* en cultivos celulares. El procesado de estas muestras se describirá en el apartado 3.6 (Cultivo de células endometriales).

Las muestras de líquido peritoneal se guardaron en nevera hasta la finalización del procedimiento quirúrgico. El líquido peritoneal se centrifugó inmediatamente después a 1.500 x g a 4 °C durante 30 minutos con el fin de separar las células y el sobrenadante. El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta su posterior cuantificación proteica. Los sobrenadantes de los líquidos peritoneales usados en los experimentos de cultivos se filtraron a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 µm antes de almacenarse a -80 °C. La mezcla de los distintos líquidos peritoneales se realizó a partir de las distintas alícuotas, descongeladas inmediatamente antes del experimento.

Tabla 3.1. Resumen del número de muestras procesadas.

	Sangre (n)	Endometrio (n)	Lesión endometriósica (n)	Muestras pareadas de endometrioma ovárico y endometrio (n)	Líquido Peritoneal (n)
Pacientes (total)	186	67	84	40	66
III-IV	167	40 + 14 (cultivo)	71 (endometrioma ovárico)	40	53
I-II	19	13	13 (implante peritoneal)	-	13
Controles	220	50 + 6 (cultivo)	-	-	35

3. 3. TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

La cuantificación del mRNA tiene como principal problema la inestabilidad de la propia molécula. Además, es degradado por las ribonucleasas (RNAsas), enzimas ubicuas, extremadamente estables, altamente resistentes al calor, activas en un amplio rango de pH y que no requieren de cofactores [612].

Esta técnica se realizó tanto en los extractos tisulares como en los extractos de cultivos de células endometriales.

3. 3. 1. EXTRACCIÓN DEL RNA

La extracción de RNA se realizó mediante cromatografía de adsorción en columna de silicagel, con el kit comercial RNeasy de Qiagen. Primero se lisa y homogeneiza el tejido en presencia del tampón RLT, que contiene isocianato de guanidinio (un agente desnaturante que inactiva las RNAsas para asegurar el aislamiento del RNA intacto) y β -mercaptoetanol (que contribuye a la desnaturación proteica por rotura de puentes disulfuro de las RNAsas). Luego se añade etanol, para proporcionar las condiciones adecuadas de unión del RNA a la membrana de silicagel situada en una columna, y se introduce la muestra en esta columna. Los posibles contaminantes se eliminan a través de sucesivos lavados con los tampones RW1 y RPE, que también contienen isocianato de guanidinio. Finalmente el RNA se eluye de la columna con un mínimo de 30 μ l de agua libre de RNAsas.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se corta una pieza de tejido, almacenado en nitrógeno líquido, de unos 30-40 mg de peso y se le añade 600 μ L del tampón RLT con β -mercaptoetanol al 1 % (v/v).
2. Se lisa y homogeneiza la muestra con el homogeneizador ultra-turrax T-50 (IKA-WERKE).

3. Una vez la muestra adquiere un aspecto homogéneo, se centrifuga a 13.000 rpm durante 3 min.
4. Se recupera el sobrenadante, se lleva a un tubo eppendorf nuevo, se le añade un volumen igual de etanol al 70 % y se incuba durante diez minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital.
5. La solución se introduce en la columna de silicagel y se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 segundos.
6. Se lava la membrana, que contiene el RNA adherido con 700 μ L de tampón RW1 centrifugando a 10.000 rpm durante 15 segundos.
7. Se lava la membrana dos veces con 500 μ L de tampón RPE centrifugando a 10.000 rpm durante 15 segundos. Finalmente, se elimina cualquier resto de tampón que pueda interferir en la posterior elución, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 min.
8. Se transfiere la columna al tubo de elución, se añade 100 μ L de H₂O libre de RNasas y se centrifuga a 10.000 rpm durante 2 min.
9. La concentración y pureza del RNA obtenido se determina espectrofotométricamente utilizando el NanoDrop ND-1000, que mide las absorbancias a 260 nm y a 280 nm. Sabiendo que una absorbancia de 1 unidad a 260nm corresponde a 40 μ g de RNA por ml (relación sólo válida en agua), la concentración de RNA la calcula el software del NanoDrop automáticamente siguiendo la ecuación: [RNA (ng/ μ l)] = A₂₆₀ (UA) x 40. El RNA purificado se almacenó a -80 °C en agua libre de RNasas.

3. 3. 2. TRATAMIENTO CON DNasa

No hay ningún método de purificación de RNA que garantice que el RNA esté completamente libre de DNA genómico, aunque no sea visible en gel de agarosa. Por lo que para evitar interferencias del DNA en la RT-PCR, se digieren los restos de DNA genómico con una DNasa libre de RNasas.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. En un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml libre de RNAsas se introduce 1 µg de RNA de las muestras a valorar, en un volumen máximo de 8 µl, ajustando el volumen con agua libre de RNAsas (tratada con DEPC) hasta los 8 µl. En una de las muestras se realiza esta operación por duplicado para obtener el control negativo de la RT. A esta muestra no se le añadirá posteriormente la RT, lo que permitirá comprobar que solo amplifica el cDNA y no el DNA genómico. También se usa una muestra sólo con agua que seguirá todo el proceso posterior (tratamiento con DNasa y retrotranscripción) y servirá de control negativo de todo el proceso de la RT-PCR.
2. A continuación se añade 1 µl del tampón de reacción 10X (Invitrogen), formado por Tris-HCl 200 mM (pH 8,4), MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM. Y por último, 1 µl de la enzima DNasa I Amp Grade (1U/µl) (Invitrogen).
3. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 15 min, para que actúe la DNasa.
4. A continuación la DNasa I se inactiva térmicamente, tras la adición de 1 µl de EDTA 25 mM (pH 8,0) e incubación a 65 °C durante 10 min. Luego se deja enfriar en hielo de forma que la muestra ya está lista para ser usada en la RT.
5. Las muestras se mantienen en hielo y se continúa inmediatamente con la RT, o bien se guardan a -80 °C.

3. 3. 3. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La retrotranscripción genera una copia de DNA complementario a la hebra de RNA (cDNA) estable al calor y que será amplificada por la Taq polimerasa.

La transcripción reversa se llevó a cabo con la enzima comercial SuperscriptTM Reverse Transcriptase RNase H⁻ (Gibco BRL).

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Las muestras de RNA tratadas con DNasa (1 ug de RNA en 10 ul) se mantienen en hielo (o se descongelan en hielo) mientras se prepara la siguiente mezcla de reacción:

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concentración final</i>
H ₂ O-DEPC	5,50 µl	
Tampón RT 1 st strand 5X	6 µl	1X
DTT (0.1M)	3 µl	10 mM
RNaseOUT (40U/µl)	1,5 µl	2U/ µl
oligo (dT) ₁₅ (60µM)	1,5 µl	3 µM
dNTPs mix (10mM)	1,5 µl	0,5 mM
SuperScript RT RNaseH ⁻ (200U/µl)	1 µl	6,67 U/ µl

2. A cada muestra de RNA tratada con DNasa, así como al control con agua, se le añade 20 µl de la mezcla de reacción. Al control negativo de la RT (DNasa⁺RT⁻) se le añade 19µl de la mezcla de reacción, antes de añadir el enzima SuperScript RT RNaseH⁻ y 1µl de agua.
3. Las muestras se incuban a 42 °C durante 1 hora, para que actue la enzima, y luego se inactiva térmicamente incubándola a 95 °C durante 5 minutos. Después se enfría la muestra en hielo.
4. El producto de la RT se diluye 1/10 con agua destilada (5 µl en 45 µl de agua) y se congela a -20 °C hasta su uso.

3. 3. 4. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la desarrolló el grupo de Kary Mullis [613-615]. Permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de DNA situado entre dos oligonucleótidos que sirven como cebadores para una serie de reacciones de síntesis catalizadas por la polimerasa de DNA. El proceso tiene una

sucesión de ciclos de temperatura en los que se produce desnaturalización del DNA molde, hibridación de los cebadores con el DNA molde y extensión de los cebadores por la DNA polimerasa, usando desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). Como los productos de un ciclo pueden usarse como molde para el ciclo siguiente se produce acumulación exponencial de fragmentos de DNA cuyos extremos estarán definidos por los extremos 5' de los cebadores[616].

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real es un refinamiento de la reacción de PCR original. El grupo de Higuchi [617, 618] fue el primero en llevar a cabo la técnica de la PCR en tiempo real, usando una videocámara para detectar la acumulación de producto de PCR en cada reacción, median el incremento de la fluorescencia de bromuro de etidio, que aumenta su fluorescencia en presencia de dsDNA, permitiendo así combinar la amplificación, la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos. Esta técnica se caracteriza por ser altamente sensible, cinco órdenes de magnitud mayor que las técnicas de blotting, y por permitir trabajar con un gran rango dinámico, de hasta 10 órdenes de magnitud. Todo ello hace que esta técnica sea de gran utilidad para la cuantificación de la expresión génica.

Seguimiento de la PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es como una PCR convencional, pero realizada en presencia de fluoróforos que se unen al DNA (de forma independiente de secuencia o forma específica a una secuencia concreta) emitiendo fluorescencia y en un termociclador con sensores que detectan la fluorescencia tras excitar a estos fluoróforos con una longitud de onda apropiada.

El termociclador en tiempo real utilizado fue el LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany). La PCR se llevó a cabo en pequeños capilares de vidrio, que se introducen en un rotor tipo carrusel, y se calientan y enfrían por corrientes de aire [619, 620]. El carrusel rota haciendo pasar un haz de luz azul de 470 nm emitido por un diodo a través de los capilares, y la fluorescencia se lee por diodos de

fotodetección. Esta señal se analiza por el software (versión 3.5), permitiendo seguir la reacción en tiempo real y la cuantificación del producto amplificado.

El fluoróforo utilizado fue el SYBR Green I, que en disolución emite poca fluorescencia, pero al unirse al surco menor del DNA de doble cadena (dsDNA) de forma independiente de secuencia, su fluorescencia aumenta más de 100 veces [621], emitiendo luz verde ($\lambda_{\text{máx}}=522\text{nm}$) al ser excitado por luz azul ($\lambda_{\text{máx}}=488\text{nm}$).

Durante la reacción de PCR la señal de fluorescencia se mide al final de cada etapa de elongación, permitiendo el seguimiento de la reacción de PCR en tiempo real. En la desnaturalización, el SYBR Green I no unido emite poca fluorescencia. En la fase de hibridación de los cebadores, unas pocas moléculas del fluoróforo se unen a la doble cadena de cDNA-cebador (y producto de PCR cebador), dando lugar a un ligero aumento de la fluorescencia. Y es al final de la etapa de polimerización cuando hay un mayor número de moléculas de SYBR Green I que se unen al producto de PCR recién sintetizado. Tras una nueva desnaturalización, las dos hebras del producto de PCR se separan, liberándose el fluoróforo y cayendo de nuevo la fluorescencia a la señal de fondo [622].

El seguimiento de la PCR en tiempo real (midiendo la intensidad de fluorescencia en cada ciclo con el LightCycler) permite identificar fácilmente los ciclos en los que se produce la fase de crecimiento exponencial, en los que la eficacia de amplificación de cada reacción es constante. El incremento de la señal producido en esta fase se corresponde directamente con el incremento en el DNA amplificado, lo que permite realizar una cuantificación con exactitud. Sin un seguimiento de la reacción en tiempo real es difícil identificar estos ciclos [623]. Así pues, esta monitorización permite la determinación de los puntos de corte o Cp's ("*crossing points*") en la fase exponencial de la PCR. El Cp es el ciclo en el que se asume que se llega a la misma cantidad de producto en cada curva, considerándose el punto más exacto proporcional a la concentración inicial [623]. La recta estándar la calcula el software del LightCycler automáticamente mediante el método del máximo de la segunda derivada ("*Second Derivative Maximum Method*").

El principal problema del SYBR Green I es que se une a cualquier dsDNA, dando señal de productos específicos, pero también de productos inespecíficos y de dímeros de cebadores. Este problema se evita optimizando la reacción de PCR y utilizando kits de Fast-Taq para realizar un “hot-start”, lo que ayuda a evitar la formación de dímeros de cebadores.

Además, el LightCycler permite un análisis de las curvas de fusión de los productos de la reacción. Lo que nos permite evitar realizar un análisis de los productos de PCR una vez se ha optimizado la técnica.

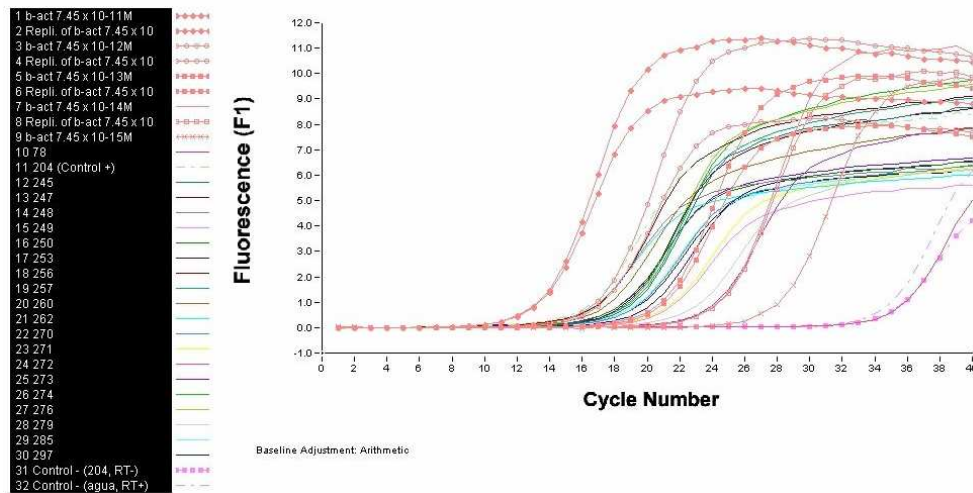


Figura 3.1. Seguimiento de la reacción de PCR en el software del LightCycler. Las líneas continuas con figuras geométricas se corresponden a los estándares, las líneas continuas sin figuras a las muestras y las líneas discontinuas a los controles.

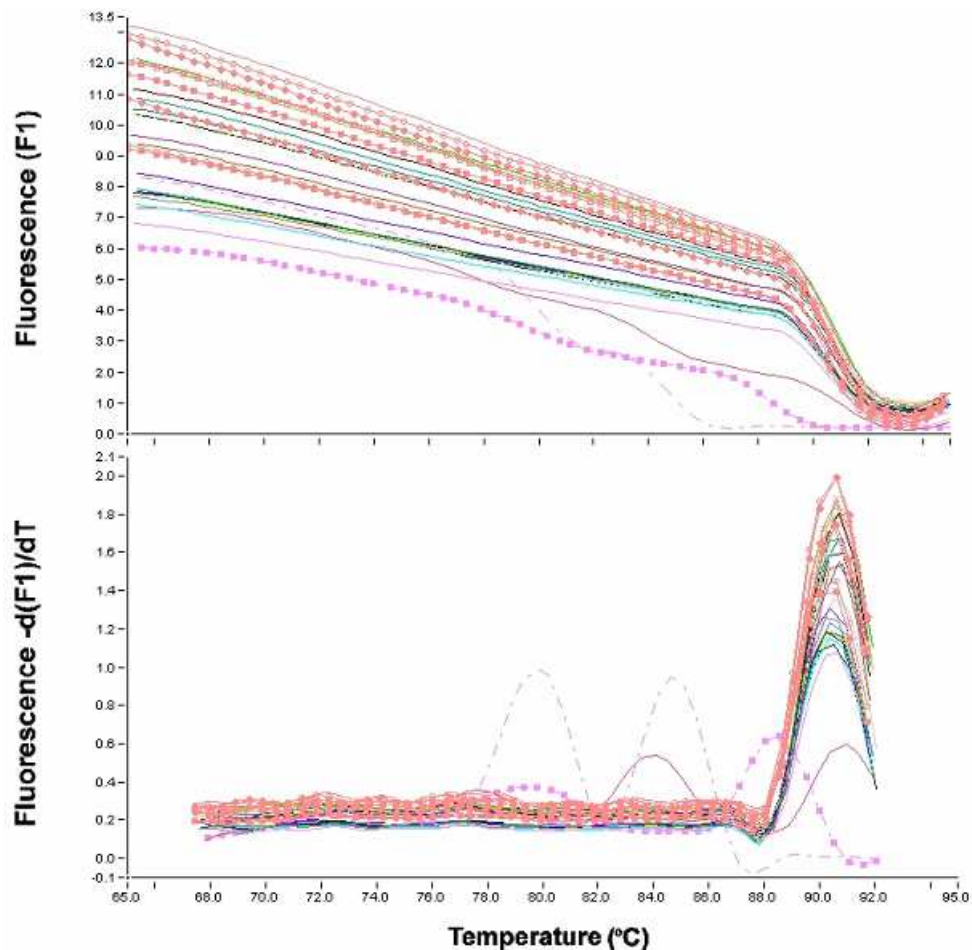


Figura 3.2. Análisis de la curva de desnaturalización. En la parte superior se muestran las “curvas de desnaturalización” al representar la fluorescencia frente a la temperatura. Y en la parte inferior los “picos de desnaturalización” al representar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura frente a la temperatura. Las líneas continuas con figuras geométricas se corresponden a los estándares, las líneas continuas sin figuras a las muestras y las líneas discontinuas a los controles. Observamos que tanto los controles negativos que dan señal en la Figura 3.1 (líneas discontinuas) como una de las muestras dan productos distintos al deseado, produciendo uno o varios “picos de desnaturalización” desplazados a la izquierda, con lo que dan lugar a productos de PCR distintos. Así pues, se pueden distinguir las muestras en las que haya formación de otros productos de PCR distintos al deseado.

Cuantificación relativa a un gen “housekeeping” con estándares externos

En este tipo de cuantificación los resultados se expresan como cociente del mRNA en estudio, o mRNA diana, frente al mRNA de un gen “housekeeping” (o de mantenimiento), de expresión constitutiva y no regulado, con un número constante de copias en todas las muestras. De esta forma se normalizan las diferencias presentes de muestra a muestra. En nuestro caso, determinamos la abundancia de los transcritos que deseamos cuantificar con respecto a un gen de referencia, la β -actina, que codifica para una proteína del citoesqueleto.

Para realizar este tipo de cuantificación se necesita, tanto del mRNA diana como del mRNA de referencia, un estándar externo (se corre en distintos capilares que las muestras), exógeno (no está de forma natural en la muestra) y de secuencia homóloga (se amplifica con el mismo juego de cebadores que las muestras). En nuestro caso, se usa como estándar un producto de PCR purificado y cuantificado. Con estos estándares, de concentración conocida, se realiza una serie de diluciones seriadas (antes de cada uso) y se amplifican en la misma carrera del LightCycler a la vez que las muestras de cDNA. La recta estándar, calculada por regresión lineal, pasa por los puntos generados en una gráfica en la que se representa el C_p , de cada dilución del estándar, frente al logaritmo de su concentración. Se deben usar unos 4 o 5 puntos para hacer una recta estándar, cubriendo el rango esperado del mRNA diana. El software del LightCycler calcula los C_p 's para los estándares y las muestras y realiza todos los cálculos necesarios para generar la recta estándar, representando los valores de C_p frente al logaritmo de su concentración inicial. Luego, se obtiene la concentración de las muestras al interpolar sus C_p 's en la recta estándar [622]. El análisis de los datos, para calcular la concentración de los genes diana y referencia, lo realiza automáticamente el software del LightCycler. Pero el cálculo del ratio mRNA diana/ mRNA referencia, en cada muestra, se ha de realizar manualmente o con la ayuda de un programa de cálculo como el MS Excel.

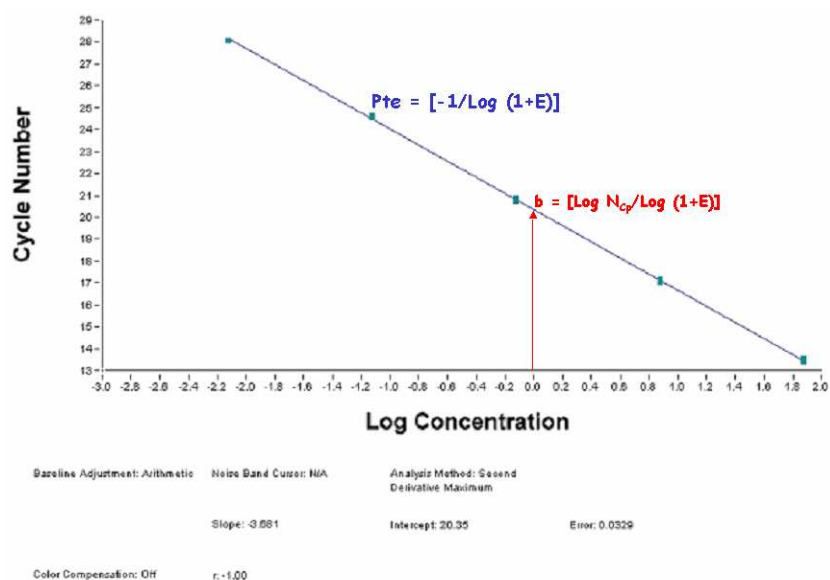


Figura 3.3. Recta estándar obtenida automáticamente, por regresión lineal, con el software del LightCycler. El software también calcula la eficacia de la reacción de amplificación y cuantifica las muestras.

Preparación de los estándares de cDNA

Se obtuvo un estándar de cada uno de los genes a analizar (uPA, PAI-1, MMP-3, TIMP-1, VEGF-A, PIGF, TSP-1) y otro para la β -actina, el gen “housekeeping” usado para normalizar la expresión. Cada uno de estos estándares se obtuvo tras realizar una retrotranscripción seguida de una PCR en distintas muestras de mRNA procedente de tejido endometrial. La amplificación se realizó mediante una PCR de tipo “hot-start”, para evitar amplificaciones de productos inespecíficos (sobre todo de dímeros de cebadores) debidas a la hibridación inespecífica de los cebadores a bajas temperaturas (de 4 a 25 °C) antes del comienzo de la amplificación. Para hacer esta PCR se utilizó la FastStart Taq DNA polimerasa (Roche), que permanece inactiva durante todo el periodo de preparación de la mezcla de reacción.

La reacción de PCR, para cada muestra, contenía 5 μ L de cDNA (diluido 1:10), 200 μ M dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada cebador, 1X del tampón de reacción sin

MgCl₂ (Roche), 1 unidad de FastStart Taq polimerasa (Roche) y agua hasta un volumen final de 50 µL. La PCR se llevó a cabo en un termociclador convencional de Eppendorf con las siguientes condiciones:

- 1) Se realiza un paso de desnaturalización inicial del DNA y de activación de la polimerasa, modificada químicamente, calentando a 95 °C durante 6 minutos.
- 2) Se realizan 35 ciclos con las siguientes condiciones:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	30
Hibridación	62	30
Elongación	72	60

- 3) Extensión final a 72 °C durante 10 min.

Para obtener suficiente cantidad de estándar, para cada uno de los genes, se hicieron varias amplificaciones. Se usó una alícuota de 1 µl para realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7 % en tampón TBE pH 8,0, a fin de confirmar la presencia de una sola banda del tamaño esperado. El resto del producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE pH 8,0, se cortó la banda de interés con una cuchilla visualizándola con luz ultravioleta (UV) y se purificó mediante cromatografía de absorción (Qiaquick PCR Purification Kit, de Qiagen). Posteriormente se cuantificó mediante la reacción con picogreen (Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent, de Invitrogen) [624], fluoróforo que permite cuantificar hasta 50 pg de DNA de doble cadena en un volumen de ensayo de 200 µl, con una gran especificidad, usando un lector de fluorescencia con microplacas. Después, este estándar altamente concentrado se almacena en alícuotas a -80 °C para evitar su degradación.

Condiciones de reacción

Para la cuantificación génica de β-actina, uPA, PAI-1, PAI-3, MMP-3, TIMP-1, VEGF-A, PIGF y TSP-1 se empleó el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). Este kit usa el SYBR Green I para la detección del DNA de doble

cadena y una Taq polimerasa que se activa por calor, la cual minimiza la amplificación de productos no deseados.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, conteniendo 1,5 μ L de cDNA (diluido 1:10), 3 mM MgCl₂, 0,3 μ M de cada cebador en el caso de la β -actina y 0,5 μ M para el resto (Tabla 3.2) y 1 μ L de la mezcla de LightCycler® Fast-Start DNA Master SYBR Green I (10X). Esta mezcla contiene el enzima FastStart Taq DNA polimerasa, tampón de reacción y una mezcla de dATPs, dCTPs, dGTPs y dUTPs (estos últimos sustituyen a los dTTPs). El volumen final hasta 10 μ l se completó con agua.

La mezcla de la reacción se introdujo en los capilares (LightCycler Capillaries, Roche) por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 segundos.

Los capilares con la mezcla de reacción se colocaron en el rotor, y éste en el termociclador en tiempo real LightCycler de Roche, donde se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

1. Calentamiento inicial, a 95 °C durante 10 min, en el que se desnatura el cDNA y se activa la FastStart Taq DNA polimerasa.
2. Se realizan 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación (al final del cual se detectaba la intensidad de fluorescencia) con las siguientes condiciones:

	Desnaturalización	Hibridación	Elongación
β -actina	95 °C/ 15 seg	62 °C/ 5 seg	72 °C/ 18 seg
uPA, PAI-1, PAI-3, MMP-3 y TIMP-1	95 °C/ 15 seg	60 °C/ 5 seg	72 °C/ 18 seg
VEGF-A y PIGF	95 °C/ 10 seg	60 °C/ 10 seg	72 °C/ 10 seg
TSP-1	95 °C/ 10 seg	62 °C/ 10 seg	72 °C/ 12 seg

3. Se genera una curva de desnaturalización, mediante el calentamiento a 95 °C e inmediato enfriamiento a 65 °C, manteniéndose esta temperatura durante 15 s, tras lo cual se realiza un aumento paulatino de la temperatura desde los 65 °C hasta los 95 °C, a una velocidad de 0,1 °C/s, midiéndose la fluorescencia de manera continua.

Controles usados en la real-time RT-PCR

En cada una de las reacciones, además de los estándares y de las muestras, se incluyó una serie de controles. Un control negativo de la RT-PCR (agua; DNasa+, RT+), en el que se usa agua, en lugar de mRNA, tanto desde el tratamiento con DNasa, como en la RT y en la posterior PCR. Este control sirve para indicar si hay algún tipo de contaminación durante todo el proceso. Un control negativo de la RT (RNA muestra; DNasa +, RT-), en el que se usa una de las muestras siguiendo todo el proceso, pero no se le añade enzima SuperScript para la RT. Este control nos permite comprobar que sólo amplifica el cDNA y no el DNA. Y un control positivo de referencia (RNA muestra; DNasa +, RT+), en el que se utiliza una muestra previamente usada. Este control nos permite comprobar que no se ha cometido ningún error en el ensayo, así como estimar la variabilidad interensayo.

Diseño de cebadores para la amplificación por PCR

Los cebadores se diseñaron flanqueando intrones para evitar contaminaciones con DNA genómico, dificultando su amplificación debido al gran tamaño del fragmento, y en el caso de que se produjesen poder detectar su presencia por análisis de la curva de desnaturalización o mediante electroforesis. Además, se añade un control negativo de la RT, que no debe amplificar.

En la Tabla 3.2 se muestran las características de los cebadores utilizados, sintetizados por Gibco-BRL, para el análisis de la expresión de uPA, PAI-1, PAI-3, MMP-3, TIMP-1, VEGF-A, PIGF, TSP-1 y β -actina. Los cebadores de β -actina, uPA, PAI-1, TIMP-1, VEGF y PIGF se obtuvieron de la literatura (ver referencias en la tabla). El resto de cebadores se sintetizaron usando un software específico "Oligo 4.0." (PAI-3 y MMP-3) y "Primer3" (TSP-1). Para asegurarnos de que los cebadores escogidos eran específicos, sus secuencias se compararon mediante el programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 3.2. Características de los cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica

Gen y número de la secuencia de referencia del mRNA del NCBI	Nombre del cebador y Secuencia del oligonucleótido 5'→3' (Referencia)	Longitud (Cebador y Producto de PCR)	% GC (Cebador y Producto de PCR)	Tm (Cebador y Producto de PCR)	Masa Molecular (Producto de PCR)
UPA (PLAU) NM_002658.2	uPAex8_F: CACGCAAGGGGAGATGAA [93] uPAex10_R: ACAGCATTTTGGTGGTGACTT	18nt / 341pb 21nt	56% / 53% 43%	51°C / 86°C 52°C	210278 Da
PAI-1 (SERPINE1) NM_000602.2	PAI-1ex4_F: TGCTGGTGAATGCCCTCTACT [93] PAI-1ex6_R: CGGTCATTCCAGGTTCTCTA	21nt / 399pb 21nt	52% / 57% 52%	54°C / 87°C 54°C	244272 Da
MMP-3 (STROMELYSIN1) NM_002422.3	MMP-3ex7_F: AGCAAGGACCTCGTTTTTCATT [95] MMP-3ex9_R:GTCAATCCCTGGAAAGTCTTCA	21nt / 261pb 22nt	43% / 43% 45%	53°C / 82°C 52°C	161693 Da
TIMP-1 NM_003254.2	TIMP-1ex2_F: CTGTTGTTGCTGTGGCTGATA [625] TIMP-1ex6_R: CCGTCCACAAGCAATGAGT	21nt / 481pb 19nt	48% / 56% 53%	54°C / 87°C 52°C	296155 Da
VEGF NM_003376.4	VEGFex2/3F: ATCACGAAGTGGTGAAGTTC [626] VEGFex4R: TGCTGTAGGAAGCTCATCTC	20nt / 265pb 20nt	45% / 52% 50%	50°C / 86°C 53°C	163778 Da
PIGF (PGF) NM_002632.4	PIGFex4F: CCTACGTGGAGCTGACGTTCT [627] PIGFex5/6R: TCCTTTCCGGCTTCATCTTCT	21nt / 78pb 21nt	57% / 60% 48%	57°C / 83°C 54°C	48307 Da
TSP-1 (THBS1) NM_003246.2	THBSex3_F: TGTGAAAAGATGGAGAATGCTG [10] THBSex5_R: TTGTGGCCAATGTAGTTAGTGC	22nt / 275pb 22nt	41% / 54% 45%	53°C / 86°C 53°C	169482 Da
β-actina (ACTB) NM_001101.3	B-ACTINex4_F: CGTACCACTGGCATCGTGAT [628] B-ACTINex5_R: GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG	20nt / 452pb 21nt	55% / 60% 52%	54°C / 88°C 53°C	278095 Da

En la tabla se indican las características de los cebadores. Entre corchetes se proporciona la referencia de la técnica (modificada para su optimización) y de los cebadores utilizados. El % GC y la Tm se han calculado con el Oligo Calculador (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>). En cada columna de características (longitud, %GC y Tm) a la izquierda están los datos de cada cebador y a la derecha los del producto de PCR.

3. 4. TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3. 4. 1. EXTRACCIÓN PROTEICA

La extracción proteica se realizó en los extractos de tejido endometrial y de lesión endometriósica.

Los extractos citosólicos de las muestras se obtuvieron por homogeneización del tejido en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, que contenía EDTA 1,5 mM y 10 % de glicerol. La suspensión se centrifugó a 100.000 x g, a una temperatura de 4 °C durante 15 minutos, para separar la fracción citosólica (sobrenadante) de la fracción de membrana (precipitado o *pellet*). El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80 °C [629]. Los extractos de membrana se obtuvieron por solubilización del *pellet*, obtenido en la etapa anterior, en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 125 mM y Tritón X-100 al 1 %, se incubaron toda la noche a 4 °C y se centrifugaron a 100.000 x g, a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante (extracto de membrana) se almacenó en alícuotas a -80 °C [629].

3. 4. 2. CUANTIFICACIÓN PROTEICA

3. 4. 2. 1. Cuantificación de proteínas totales

Para poder normalizar los niveles antigénicos obtenidos en los extractos de tejido endometrial y endometriósico, se determinó la cantidad total de proteína en las muestras utilizando el ensayo de proteína BCA (BCA assay, Pierce, Rockford, IL).

La técnica consiste en una reacción colorimétrica, en la que los resultados de la muestra se interpolan a los obtenidos con una recta patrón de concentración conocida de albúmina de suero bovino (*BSA*) fracción V (*Sigma*). El ensayo combina la reducción del catión cúprico (Cu^{2+}) a cuproso (Cu^+) que se produce en las proteínas en medio básico, con la propiedad de detección del catión cuproso por el ácido bicinconínico (BCA) [630]. El BCA es un reactivo de detección de Cu^+ (catión cuproso) altamente sensible y El producto de la reacción coloreada de este ensayo se forma por la interacción de dos moléculas de BCA con una de catión cuproso (Cu^+). Este complejo es soluble en agua y

exhibe una fuerte absorbancia a 562nm (púrpura), permitiendo una cuantificación espectrofotométrica de la proteína en solución acuosa. Tanto las muestras como los controles se determinaron por duplicado para comprobar la reproducibilidad de la cuantificación.

3. 4. 2. 2. *Cuantificación proteica mediante ELISAs*

Los niveles proteicos de los distintos componentes de la angiogénesis y del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas se determinaron en los extractos tisulares (citoplasmáticos y de membrana), en el líquido peritoneal y en los sobrenadantes de los cultivos mediante técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA).

La descripción inicial del ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) tiene casi 40 años [631] y representó un gran avance tecnológico con aplicaciones científicas tanto básicas como clínicas.

Detección de Antígenos solubles mediante ELISA de tipo Sándwich

Este tipo de ELISA es el más usado, ya que es de 2 a 5 veces más sensible que aquellos en los que el antígeno se une directamente a la fase sólida. Para detectar el antígeno, los pocillos de las microplacas (con elevada capacidad de unión a proteínas), se incuban con un exceso de anticuerpo específico de captura, quedando recubiertos por éste. Cualquier sitio disponible en los pocillos de la placa es bloqueado con el uso de una proteína irrelevante como la albúmina de suero bovino (BSA). Las muestras, estándares y controles son incubados en la microplaca, para lograr la unión del antígeno de la muestra al anticuerpo de captura.

El antígeno no unido al anticuerpo de captura se lava y se añade un exceso de un segundo anticuerpo específico, generalmente distinto del de captura, llamado de detección, que reconocerá un epítipo diferente de la misma molécula antigénica, formando el complejo sándwich. Este anticuerpo de detección puede estar conjugado con biotina o directamente con un enzima como la peroxidasa de rábano (HRP) o la fosfatasa alcalina (AP).

Tras el lavado para eliminar la fracción de anticuerpo conjugado que no se ha unido al antígeno (y adición de streptoavidina conjugada y su consiguiente lavado, si usamos este sistema) se añadirá un sustrato apropiado para el enzima usado. Tras una incubación apropiada, se mide el grado de hidrólisis del sustrato. La cantidad de sustrato hidrolizado será proporcional a la cantidad de enzima unido al pocillo, la cual a su vez es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra [632, 633].

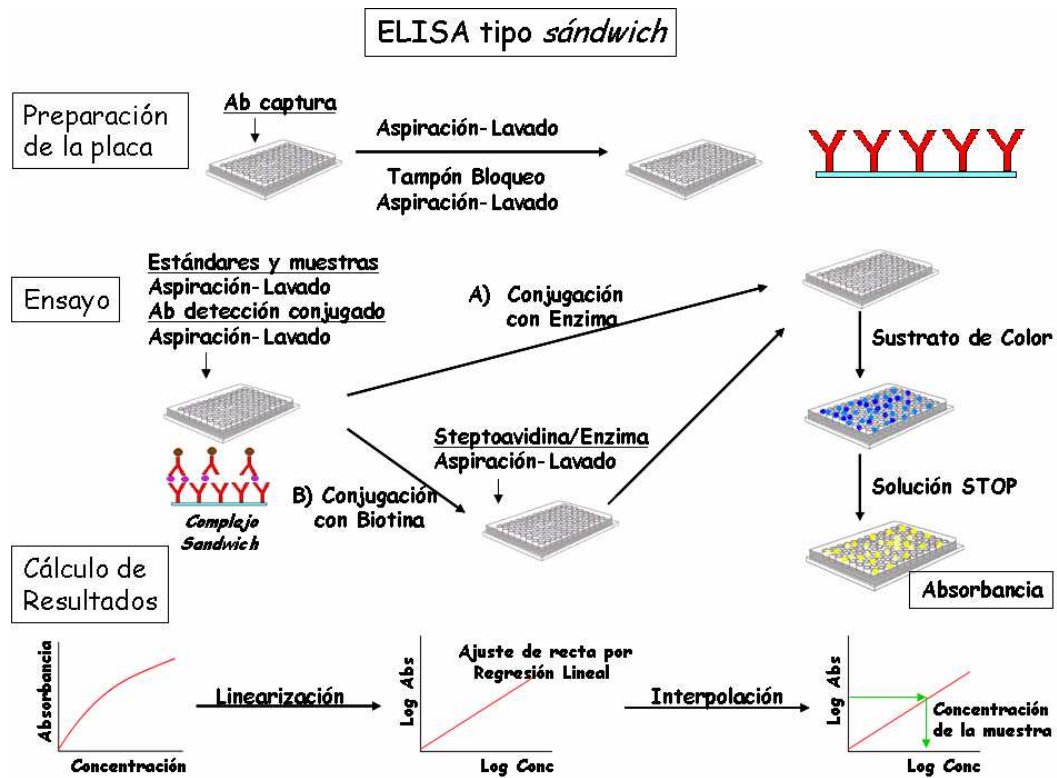


Figura 3.4. Esquema general de un ELISA tipo *sándwich*.

Técnica de ELISA para la cuantificación del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en extractos tisulares y líquido peritoneal

La técnica para cuantificación proteica de los niveles de PAI-1 en los extractos tisulares y líquidos peritoneales se realizó mediante un ELISA comercial (Tint Elize PAI-1, Biopool).

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

Básicamente, el protocolo utilizado es el siguiente:

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

- 7) Se reconstituye el sustrato ortofenildiaminodihidrocloro (OPD) con 22 ml de agua bidestilada y se añade, en el momento de utilizarlo, el vial de H₂O₂. Se añade 200 µl de sustrato a cada pocillo. Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- 8) Se añade 50 µl de solución STOP (H₂SO₄ 3,3M), se mide la absorbancia a 492 nm y se sustrae la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas MRX Revelation (Thermo Labsystems, Chantilly VA, EEUU). La concentración se calcula a partir de la curva patrón obtenida con los valores de absorbancia producidos por los estándares.

Técnica de ELISA para la cuantificación del PAI-1 en sobrenadantes de cultivos de células endometriales

Los niveles antigénicos de PAI-1 se determinaron con un ELISA comercial (Imubind tissue PAI-1, America Diagnostica, EEUU). El ensayo detecta PAI-1 libre y en forma de complejo, pero es insensible al PAI-2. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 3-4 % y 6-8 %, respectivamente.

Técnica de ELISA para la cuantificación del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales

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

Técnica de ELISA para la cuantificación de la metaloproteasa tipo 3 (MMP-3) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales

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

Técnica de ELISA para la cuantificación del inhibidor tipo 1 de las metaloproteasas (TIMP-1) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales

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

Técnica de ELISA para la cuantificación del factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo A (VEGF-A) en extractos tisulares, líquido peritoneal y sobrenadantes de cultivos de células endometriales

Los niveles antigénicos de VEGF-A se evaluaron mediante un ELISA comercial (Human VEGF, IBL International, Germany). No se observó reacción cruzada o interferencia con PIGF. Este ensayo reconoce las isoformas humanas del VEGF-A₁₆₅ y VEGF-A₁₂₁. La variabilidad intra- e interensayo fue 4-6 % y 7-10 %, respectivamente.

Técnica de ELISA para la cuantificación del factor de crecimiento placentario (PIGF) en extractos tisulares y líquido peritoneal

Los niveles antigénicos de PIGF se evaluaron mediante un ELISA comercial (Human PIGF, ELISA Development System, DuoSet, RD systems, Minneapolis, MN). No se observó reacción cruzada con el VEGF-A.

Técnica de ELISA indirecto para la cuantificación de la trombospondina de tipo 1 (TSP-1) en extractos tisulares y sobrenadantes de cultivos de células endometriales

Los niveles de TSP-1 se cuantificaron mediante un ELISA indirecto, previamente descrito [10]. Básicamente el protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Las placas de ELISA (MaxiSorp surface, Nunc) se incubaron toda la noche con 100 μ l TSP-1 (20-40 μ g/ml) obtenida de plaquetas humanas.
2. Las muestras a valorar y los estándares (400-12 ng/ml TSP-1, Sigma) se incubaron toda la noche en tubos de ensayo con un exceso de anticuerpo policlonal de conejo contra la TSP-1 (TSP-1 Anb-8, NeoMarkers Lab Vision Corporation).
3. Al día siguiente, se lavó la placa para eliminar el antígeno no pegado a la misma.
4. A la placa lavada se añadieron 100 μ L de las muestras y estándares unidos al anticuerpo contra la TSP-1 y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente en agitación suave (300-600 rpm), para asegurar una distribución homogénea en el pocillo.
5. La placa se lavó para eliminar el anticuerpo no unido.
6. Se añadió 100 μ L del segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (*Amersham*) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación.

Tras un nuevo lavado de la placa, se añadió 200 μ l de la solución sustrato (OPD) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos.

7. La reacción se paró con 50 μ l de una solución de H₂SO₄ 4M y se midió la absorbancia del producto coloreado formado a 490 nm, sustrayendo la absorbancia a 620 nm, en un lector de microplacas MRX Revelation (Thermo Labsystems, Chantilly VA, EEUU).

El coeficiente de variación intraensayo fue del 5 %.

3. 5. TÉCNICAS MOLECULARES USADAS EN LA DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS

3. 5. 1. EXTRACCIÓN DE DNA

Para la extracción del DNA se empleó el *Wizard Genomic Purification kit* (Promega, Madison WI, EEUU) en muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA.

Este método de purificación de DNA consiste en un proceso de cuatro pasos [634]. Primero, los eritrocitos se lisan específicamente mediante una solución que deja intactos los leucocitos. Después, los leucocitos y su núcleo son lisados y solubilizados. En una tercera etapa se eliminan, mediante precipitación salina, las proteínas liberadas al medio al degradarse las estructuras celulares, quedando el DNA genómico en solución. Finalmente, este DNA genómico es concentrado y desalado mediante una precipitación con isopropanol y, tras un lavado con etanol, es resuspendido en una solución tamponada que permite un uso y almacenamiento adecuado.

Básicamente, el proceso de extracción fue el siguiente:

- 1) A un tubo estéril de 1,5 ml, conteniendo 300 µl de una muestra de sangre total, se añade 900 µl de una solución de lisis (*Cell Lysis Solution*), y se incuba la mezcla durante 10 minutos en un agitador orbital con el fin de lisar los eritrocitos.
- 2) Luego se centrifuga a 13.000 x g durante unos 20 segundos, para que precipiten los leucocitos (forman un precipitado blanco en el fondo del tubo). Y se elimina la mayor cantidad de sobrenadante posible.
- 3) Se añade 300 µl de una segunda solución de lisis (*Nuclei Lysis Solution*) y la mezcla se pipetea varias veces para favorecer la lisis de los leucocitos. La solución se vuelve viscosa, por lo que se recomienda incubarla a 37 °C durante 1 hora hasta que los grumos hayan desaparecido. Si no fuera así, podría añadirse de nuevo 100 µl de la solución de lisis y repetir la incubación.

- 4) Opcionalmente, se puede degradar el RNA presente en la muestra añadiendo 1,5 μ l de RNasa a 4 mg/ml (*Promega*) e incubando la muestra a 37 °C durante 15 minutos. Antes de proseguir con el siguiente paso, se debe atemperar la muestra.
- 5) Para purificar el lisado nuclear se deben separar las proteínas de los restos celulares. Para ello, se añaden 100 μ l de una solución de precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) y la mezcla se agita vigorosamente durante 1 minuto hasta obtener grumos de proteínas en la solución.
- 6) Para separar la solución que contiene el DNA de los restos celulares, la muestra se centrifuga a 13.000-16.000 x g durante 3 minutos.
- 7) El sobrenadante (con el DNA) se recupera y se transfiere a un tubo estéril de 1,5 ml.
- 8) A esta solución con DNA se le añade 300 μ l de isopropanol y se incuba en un agitador orbital, para favorecer la precipitación del DNA, durante 2 minutos o hasta hacerse visible la madeja de DNA.
- 9) La muestra se centrifuga a 13.000-16.000 x g durante 1 minuto para recuperar el DNA en forma de un pequeño pellet blanco.
- 10) Se elimina el sobrenadante con cuidado, evitando eliminar el pellet de DNA. Se añaden 300 μ l de etanol 70 % y se incuba en el agitador orbital 10 minutos para lavar el precipitado y las paredes del tubo. Seguidamente, la muestra se centrifuga a 13.000 x g durante 1 minuto.
- 11) A continuación se elimina el sobrenadante con mucho cuidado y se deja secar el DNA colocando el tubo invertido sobre un papel secante durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.
- 12) La muestra de DNA se resuspende con 100 μ l de una solución de rehidratación (*DNA Rehydration Solution*): Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) y se incuba a temperatura ambiente o a 4 °C durante toda una noche. La muestra de DNA resuspendido puede almacenarse a 2-8 °C hasta su uso, o bien congelarse a -20 °C.

3. 5. 2. TÉCNICAS DE GENOTIPADO UTILIZADAS

Los polimorfismos estudiados, tanto en pacientes con endometriosis como en mujeres control, fueron los siguientes:

- 1) -675 4G/5G del gen del PAI-1 (rs1799768).
- 2) -1612 5A/6A del gen de la MMP-3 (rs3025058).
- 3) -460C/T (rs833061), +405C/G (rs2010963) y 936C/T (rs3025039) del gen del VEGF.

Los números de referencia (rs) de los polimorfismos se obtuvieron de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El genotipado de los polimorfismos se ha llevado a cabo utilizando dos técnicas diferentes.

3.5.2.1. El polimorfismo -675 4G/5G del gen del PAI-1 se genotipó mediante PCR específica de alelo.

3.5.2.2. El resto de los polimorfismos estudiados se genotiparon mediante digestión con endonucleasas de restricción obteniendo polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs).

3. 5. 2. 1. Determinación del polimorfismo -675 4G/5G del gen del PAI-1 (rs1799768) mediante PCR específica de alelo

Este método consiste en realizar dos PCR por cada muestra, cada una con un cebador específico de un alelo. De esta forma, tras la PCR, la electroforesis en gel y la tinción con EtBr, se obtiene el genotipo del individuo por la presencia/ausencia de una banda específica del producto de PCR en una posición determinada del gel, según su tamaño.

Esta PCR se realiza en unas condiciones restrictivas y con menos de 30 ciclos de amplificación para impedir la amplificación del cebador inespecífico. Aún así, en algunas

muestras puede aparecer una banda de menor intensidad debido a esta amplificación inespecífica.

Para asegurar que la banda de menor intensidad se debe a una amplificación inespecífica y no a un error en el volumen de carga del gel, se utiliza un tercer cebador en cada reacción de PCR que hibridará “upstream” en la misma hebra que los cebadores específicos. Este cebador producirá un fragmento de mayor longitud y que deberá tener la misma intensidad en las dos PCRs (Figura 3.5 y Figura 3.6).

En la Tabla 3.3 están las características de los cebadores utilizados, proporcionados por MWG-Biotech (*Roche, Highpoint WC, EEUU*). Se puede observar que los dos cebadores directos sólo se diferencian en el nucleótido del extremo 3’.

Se preparan dos mezclas de reacción en dos tubos estériles, en hielo, conteniendo los reactivos necesarios para completar una placa de 96 pocillos. La primera mezcla contiene el cebador directo que hibridará y elongará con el alelo 4G (Mix 4G) y la segunda mezcla contiene el cebador directo que hibridará y elongará con el alelo 5G (Mix 5G). Las mezclas de la reacción vienen indicadas en la Tabla 3.4. Estas mezclas se deben preparar y mantener en hielo hasta su uso.

Se dispensa 1 µl de cada una de las muestras de DNA, por duplicado, en una placa de 96 pocillos. Además de las muestras se introducen controles positivos para cada genotipo (muestras de genotipo conocido) y un control negativo con agua. Posteriormente se dispensa 19 µl de una de las mezclas de reacción (Mix 4G) en sólo una de las muestras duplicadas y otros 19 µl de la otra mezcla de reacción (Mix 5G) en la otra muestra de DNA. Se sella la placa, se introduce en un termociclador convencional (Eppendorf) y se realiza la PCR según las condiciones indicadas en la Tabla 3.4.

Tras la PCR, se toman 5 µl del producto de la PCR y se le añade 1 µl de la solución de carga 6X. Como referencia se incluyen marcadores de masa molecular, a partir de los cuales se clasifican las bandas correspondientes a las muestras problema. Las muestras se cargan en los pocillos y se someten a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 % con TBE pH 8,0, a 300V durante 12 minutos (Figura 3.6).

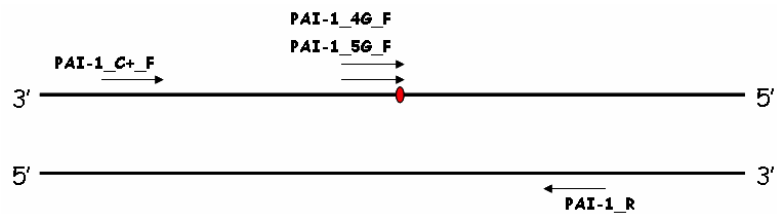


Figura 3.5. Posición de los cebadores en el promotor del gen del PAI-1. El último nucleótido de los dos cebadores específicos es distinto para reconocer el polimorfismo (en rojo). El cebador control debe formar un producto de la misma intensidad en las dos reacciones independientemente de su genotipo.

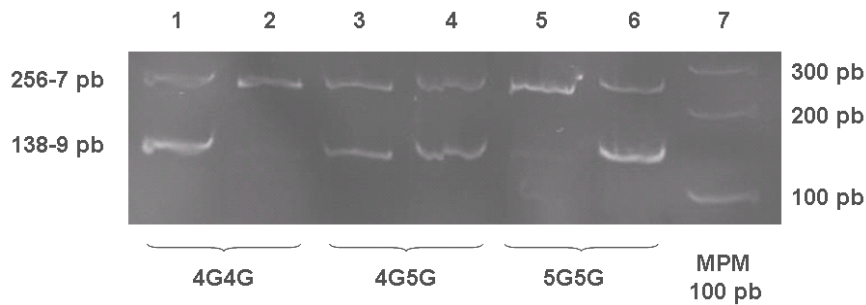


Figura 3.6. Electroforesis del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, mediante la técnica de PCR específica de alelo. La electroforesis se realiza en gel de poliacrilamida al 7 % en TBE pH 8,0, a 300V durante 12 minutos. De cada muestra se realizan dos PCRs y el producto de cada una se corre en un pocillo del gel. Los pocillos 1, 3 y 5 están cargados con muestras cuya PCR se ha realizado con el Mix 4G y los pocillos 2, 4 y 6 con el Mix 5G. En cada carrera debe aparecer la banda control de 256 pb y/o 257 pb. La presencia/ausencia de las bandas específicas de alelo (138 pb y/o 139 pb) indica el genotipo.

El gel se tiñe con bromuro de etidio y se fotografía. La presencia/ausencia de las bandas del producto de PCR específicas de alelo nos indicará el genotipo de cada individuo. De tal forma que un individuo homocigótico para el alelo 4G tendrá una banda de 256 pb (control positivo) en los dos pocillos de carga y una banda de 138 pb en el pocillo de carga del Mix 4G. Un individuo homocigótico para el alelo 5G tendrá una banda de 257 pb (control positivo) en los dos pocillos de carga y una banda de 139 pb en el pocillo de carga del Mix 5G. Y un individuo heterocigótico tendrá una banda de 256-7 pb (control positivo) en los dos pocillos de carga y una banda de 138 pb y otra de 139 pb en los pocillos de carga de los Mix 4G y 5G, respectivamente.

Tabla 3.3. Características de los cebadores utilizados para la determinación de los polimorfismos estudiados.

Gen y polimorfismo (número de referencia del SNP del NCBI)	Técnica usada para la determinación del polimorfismo (Referencia)	Nombre del cebador y Secuencia del oligonucleótido 5' → 3'	Longitud (Cebador y Producto de PCR)	% GC (Cebador y Producto de PCR)	Tm (Cebador y Producto de PCR)
PAI-1 -675 4G/5G (rs1799768)	PCR específica de alelo [234]	PAI-1_4G_F: GTCTGGACACGTGGGGA PAI-1_5G_F: GTCTGGACACGTGGGGG PAI-1_C+_F: AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT PAI-1_R: TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG	17nt/ 138pb 17nt/ 139pb 26nt/ 256-7pb 25nt	65%/ 59% 71%/ 59% 46%/ 58% 56%	52°C/ 84°C 54°C/ 84°C 58°C/ 86°C 61°C
MMP-3 -1612 5A/6A (rs3025058)	PCR-RFLP (Pdm I) [635]	MMP-3_(-1612)_F: GATTACAGACATGGGTCA MMP-3_(-1612)_R: TTCAATCAGGACAAGACGAA_GTTT	20nt / 110-1pb 25nt	45%/ 41% 36%	50°C / 76°C 53°C
VEGF-A -460C/T (rs833061)	PCR-RFLP (Bsa HI) [547]	VEGF_(-460)_F: CCTCTTTAGCCAGACCGGGG VEGF_(-460)_R: TGGCCTTCTCCCGCTCCGAC	21nt / 176pb 21nt	67%/ 64% 71%	60°C / 87°C 62°C
VEGF-A +405C/G (rs2010963)	PCR-RFLP (Bsm FI) [547]	VEGF_(+405)_F: CGACGGCTTGGGGAGATTGC VEGF_(+405)_R: GGGCGGTGTCTGTCTGTCTG	20nt / 274pb 20nt	65%/ 61% 65%	58°C / 88°C 58°C
VEGF-A 936C/T (rs3025039)	PCR-RFLP (Nla III) [547]	VEGF_(936)_F: AGGGTTCGGGAACAGATC VEGF_(936)_R: CTCGGTGATTAGCAGCAAG	19nt / 266pb 20nt	58%/ 53% 50%	53°C / 84°C 52°C

En la tabla se indican las técnicas utilizadas en el estudio de SNPs, la referencia de la técnica y de los cebadores utilizados y, además, cuando la técnica utilizada es PCR-RFLP se indica entre paréntesis la ER utilizada. Las partes de la secuencia de los cebadores subrayadas cambian con respecto a la secuencia del DNA genómico para que el producto de PCR pueda ser reconocido por la ER en la digestión posterior. La longitud de los cebadores es en nucleótidos y la de los productos de PCR en pares de bases. El % GC y la Tm se han calculado con el Oligo Calculador (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>). En cada columna de características (longitud, %GC y Tm) a la izquierda están los datos de cada cebador y a la derecha los del producto de PCR.

Tabla 3.4. Mezclas de las reacciones de PCR y Condiciones utilizadas.

	PAI-1 -675 4G/5G (rs1799768) PCR específica de alelo	MMP-3 -1612 5A/6A (rs3025058) PCR-RFLP	VEGF -460C/T (rs833061) PCR-RFLP	VEGF +405G/C (rs2010963) PCR-RFLP	VEGF 936C/T (rs3025039) PCR-RFLP
Mezcla de Reacción de PCR:					
H ₂ O	12 µl	16.8 µl	13.9 µl	12.9 µl	14.9 µl
Buffer 10X, con MgCl ₂ (20mM)	2 µl	2,5 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
Buffer 10X, sin MgCl ₂	---	---	---	---	---
MgCl ₂ (25 mM)	1,4µl (3,75mM)	2 µl (4 mM)	--- (2 mM)	--- (2 mM)	--- (2 mM)
Primers (5µM/ cada uno)	1 µl (0,25µM)*	1 µl (0,2 µM)	1 µl (0,25 µM)	1 µl (0,25 µM)	1 µl (0,25 µM)
dNTPs (10mM)	0,5 µl (0,25mM)	0,5 µl (0,2mM)	0,4 µl (0,2mM)	0,4 µl (0,2mM)	0,4 µl (0,2mM)
FastStart DNA pol Roche,5U/µl)	0,1µl (0,5U)	0,2µl (1U)	0,2µl (1U)	0,2µl (1U)	0,2µl (1U)
DNA (0.1 a 0.5 µg)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
VOL TOTAL:	20µl	25 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Condiciones de la PCR:					
<u>Pre calentamiento de la tapa:</u>	105 °C/ 3min	105 °C/ 3min	105 °C/ 3min	105 °C/ 3min	105 °C/ 3min
<u>Hot Start:</u>	95 °C/ 6 min	95 °C/ 6 min	95 °C/ 6 min	95 °C/ 6 min	95 °C/ 6 min
<u>Número de Ciclos:</u>	26 ciclos	30 ciclos	30 ciclos	30 ciclos	30 ciclos
<u>Desnaturalización</u>	95 °C/ 30s	95 °C/ 30s	95 °C/ 30s	95 °C/ 30s	95 °C/ 30s
<u>Hibridación</u>	65 °C/ 30s	53 °C/ 30s	62 °C/ 30s	60 °C/ 30s	54 °C/ 30s
<u>Extensión</u>	72 °C/ 75s	72 °C/ 1min	72 °C/ 1min	72 °C/ 1min	72 °C/ 1min
<u>Extensión final:</u>	72 °C/ 7 min	72 °C/ 7 min	72 °C/ 10 min	72 °C/ 10 min	72 °C/ 10 min
Producto de la PCR:	4G; 256 + 138pb 5G; 257 + 139pb	5A; 110 pb 6A;111 pb	176 pb	174 pb	266 pb

*El cebador PAI-1_C+_F está a concentración 0,5µM, quedando a una concentración final de 0,025µM.

3. 5. 2. 2. Determinación de los polimorfismos -1612 5A/6A (rs3025058) del gen de la MMP-3 y -460C/T (rs833061), +405C/G (rs2010963) y 936C/T (rs3025039) del gen del VEGF mediante PCR-RFLP

Las bacterias tienen un sistema defensivo basado en enzimas metilantes, que producen metilaciones en secuencias específicas, y enzimas de restricción, que reconocen esas secuencias y cortan aquellas que no están metiladas, ya que no las reconocen como propias (introducidas por infección con fagos, por conjugación o por transformación).

Las endonucleasas de restricción (ERs) de tipo II producen el corte, en ambas cadenas del DNA, en o cerca del lugar de reconocimiento, normalmente simétrico. Esta cualidad es la que las hace atractivas para la determinación de polimorfismos.

Primero es necesario realizar una PCR de una secuencia de ácidos nucleicos que contenga el polimorfismo en cuestión, en la que se obtiene una gran cantidad de producto de PCR. Después se digiere el producto de PCR con una ER que corte específicamente en un punto dado tras reconocer uno de los dos alelos. Estos fragmentos de DNA se analizan mediante una electroforesis en un gel (de agarosa o poliacrilamida), en la que migrarán hacia el ánodo de una forma proporcional al logaritmo de su masa molecular. Luego son teñidos con bromuro de etidio, que se intercala en la doble hélice del DNA emitiendo fluorescencia al exponerlo a la luz ultravioleta.

Aunque estas enzimas son activas y bastante estables en condiciones de ensayo muy diferentes, hay que tener en cuenta una serie de parámetros que influyen en su actividad (pureza y características del DNA sustrato, los cationes divalentes, la fuerza iónica, el pH del medio de reacción, la temperatura y el tiempo de incubación) para obtener digestiones de DNA reproducibles y eficientes. Por todo ello, es importante usar siempre un control positivo para el corte, ya que una digestión incompleta en una muestra de un individuo homocigoto para el corte con una ER, nos puede dar un falso heterocigoto tras realizar la electroforesis en gel y su tinción, ya que nos aparecerá la banda de la parte de producto de PCR sin digerir. También usaremos un control negativo

de la PCR con agua, que experimentará todo el proceso, para comprobar que no hay contaminación.

Se han utilizado distintos cebadores y ERs para la determinación de estos polimorfismos, obtenidos de distintas fuentes bibliográficas (indicadas en la Tabla 3.3). Para cada una de estas determinaciones se realiza una PCR para cada muestra, para un control positivo (muestra homocigota para el corte con la ER) y uno negativo (agua). En la Tabla 3.3 están las características de los cebadores utilizados. Algunos tienen la secuencia modificada (con respecto a la secuencia de DNA diana) para poder ser reconocidos y cortados por la ER utilizada en cada determinación.

La mezcla de reacción se prepara en un tubo estéril en hielo, los reactivos necesarios se descongelan en hielo, se agitan suavemente con el vortex, se centrifugan y se mantienen en hielo hasta el momento de preparar la mezcla de PCR (Tabla 3.4). Se añade 1 μ l de cada una de las muestras de DNA, junto con controles positivos (muestras de genotipo conocido) y con un control negativo con agua. Posteriormente se dispensa la mezcla de reacción. Se sella la placa, se introduce en un termociclador convencional (Eppendorf) y se realiza la PCR según las condiciones indicadas en la Tabla 3.4.

Tras la PCR se procede a la digestión directa del producto de PCR. En la Tabla 3.5 están las características de las ERs usadas para cada polimorfismo y las condiciones de digestión. La mezcla de reacción se prepara en un tubo estéril en hielo y se dispensa en una placa de 96 pocillos. Después se añade 5 μ l del producto de la PCR y se digiere con el ER y condiciones adecuadas.

Tras la digestión se toman 5 μ l del producto de la PCR digerido y se le añade 1 μ l de solución de carga 6X. Como referencia se incluyen marcadores de masa molecular, a partir de los cuales se clasifican las bandas correspondientes a las muestras problema. La muestra se somete a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7 % en TBE pH 8,0, a 300V durante 18 minutos. El gel es posteriormente teñido con bromuro de etidio y fotografiado. Se obtiene el genotipo del individuo por la posición y número de las bandas de cada una de las muestras. En la Figura 3.7 está indicada la posición de los

polimorfismos estudiados en el gen del VEGF-A y en la Figura 3.8 tenemos una fotografía de un gel con los tres polimorfismos estudiados. En la Tabla 3.5 están indicados los tamaños de los productos de la PCR tras la digestión según el alelo sobre el que actúan y por el genotipo del individuo.

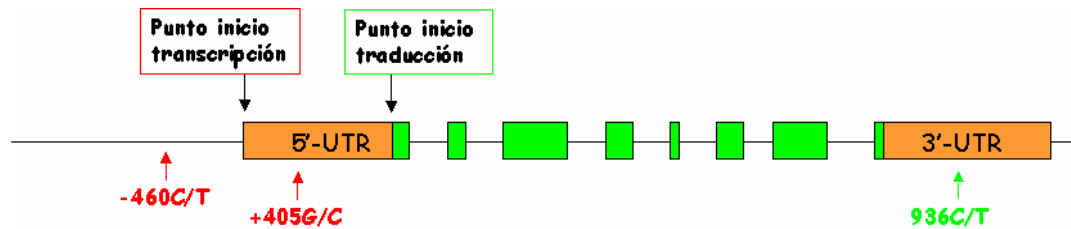


Figura 3.7. Esquema (no a escala) de la localización de los polimorfismos estudiados en el gen del VEGF. La nomenclatura de los SNPs viene referida con respecto al punto de inicio de la transcripción, con signo negativo para los nucleótidos anteriores y signo positivo para los posteriores (en rojo) y con respecto al punto de inicio de la traducción (en verde).

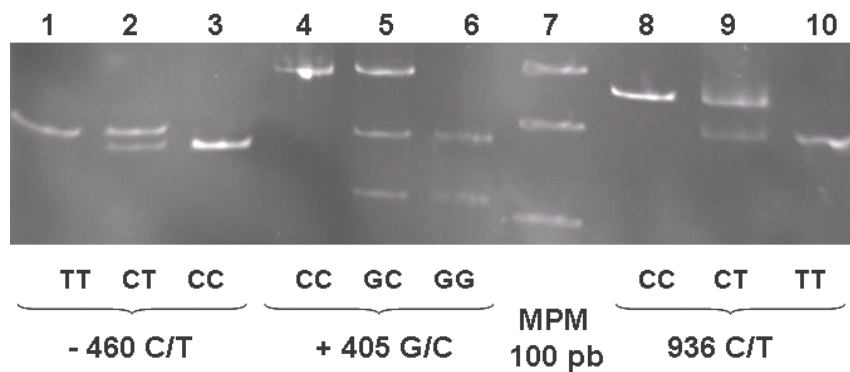


Figura 3.8. Electroforesis de los polimorfismos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF, mediante la técnica de PCR-RFLP. La electroforesis se realiza en gel de poliacrilamida al 7 % en TBE pH 8,0, a 300V durante 18 minutos. Se hace una PCR seguida de una digestión con una ER específica para uno de los dos alelos del polimorfismo. El producto de esta digestión se corre en un pocillo del gel. En las posiciones 1, 4 y 8 están los homocigotos para la no digestión, en las posiciones 2, 5 y 9 los heterocigotos y en las posiciones 3, 6 y 10 los homocigotos para la digestión.

Tabla 3.5. Características de las ERs usadas en la PCR-RFLP, condiciones de la digestión y características de los productos de la digestión.

	MMP-3 -1612 5A/6A (rs3025058)	VEGF -460C/T (rs833061)	VEGF +405C/G (rs2010963)	VEGF 936C/T (rs3025039)
ER usada:	Pdm I	Bsa HI	Bsm FI	Nla III
Casa comercial	Fermentas	New England Biolabs	New England Biolabs	New England Biolabs
Tampón usado	10X Buffer Tango	10X NEBuffer 4	10X NEBuffer 4	10X NEBuffer 4
Unidades	10 U/μl	10 U/μl	2 U/μl	10 U/μl
Reacción de la Digestión:				
H ₂ O	12,5μl	12,3μl	12,3μl	12,3μl
Tampón de digestión 10X	2μl	2μl	2μl	2μl
BSA (10 mg/ml)	(10 μg/ml)	0,2μl (100 μg/ml)	0,2μl (100 μg/ml)	0,2μl (100 μg/ml)
Endonucleasa de Restricción	0,5 μl (5U)	0,5 μl (5U)	0,5 μl (1U)	0,5 μl (5U)
Producto de PCR	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
Incubación:	37 °C/ toda la noche	37 °C/ toda la noche	65 °C/ toda la noche	37 °C/ toda la noche
Productos de la digestión (por alelo):				
Sin digerir	6A: 111pb	-460T: 176pb	+405C: 274pb	936C: 266pb
Digerido	5A: 87+23 pb	-460C: 154+20pb	+405G: 166+104 pb	936T: 207+55 pb
(extremos cohesivos)		(2 nts en 5')	(4 nts en 5')	(4 nts en 3')
Productos de la digestión (por genotipo):				
Homocitoto para la no digestión	6A6A: 111 pb	-460TT: 176 pb	+405CC: 274 pb	936CC: 266 pb
Homocitoto para la digestión	5A5A: 87+ 23 pb	-460CC: 154 +20 pb	+405GG:166 +104 pb	936TT: 207 + 55 pb
Heterocigoto	5A6A:111+ 87+ 23 pb	-460CT: 176 +154 + 20 pb	+405GC:274 +166 + 104 pb	936CT: 266 + 207+55 pb

La Unidad de actividad enzimática de las ERs se define (por convenio) como la cantidad de enzima requerida para digerir completamente 1μg de DNA (de distintas procedencias, indicado en la tabla) en un volumen de 50μl, a una temperatura determinada (indicado en la tabla) en una hora.

3. 6. CULTIVO DE CÉLULAS ENDOMETRIALES

El cultivo primario de células se realizó según se ha descrito previamente [636] con pequeñas modificaciones. La biopsia endometrial se introdujo en tampón PBS que contenía 50 U penicilina/ml y 50 µg estreptomicina/ml (Sigma), a 4°C y se procesó entre 2-18 h. El tejido se cortó en piezas de aproximadamente 1 mm³ y se incubó a 37 °C durante 60 minutos en medio DMEM/F12 en presencia de colagenasa IA (2,5 mg/ml, Sigma) y 50 U penicilina/ml y 50 µg estreptomicina/ml (Sigma). El tejido disociado se filtró a través de una gasa fina para eliminar restos tisulares sin digerir.

La pureza de las células endometriales estromales se evaluó por tinción inmunocitoquímica, usando anticuerpos frente a citoqueratina (proteína que forma el filamento intermedio del citoesqueleto de células epiteliales y glandulares), vimentina (proteína que forma el filamento intermedio del citoesqueleto de las células estromales) y CD68 (glicoproteína de membrana plasmática presente en macrófagos), y fue superior al 95 %.

La suspensión de células se centrifugó a 550 x g durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo DMEM/F12 sin Rojo Fenol, en presencia de Suero Bovino Fetal al 10 % (FBS, Invitrogen), 50 U penicilina/ml y 50 µg estreptomicina/ml (Sigma). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de exclusión del colorante *trypan blue* y era siempre superior al 95 %. Las células endometriales estromales se sembraron en un frasco de 12 cm² y se mantuvieron en atmósfera húmeda en una mezcla de aire al 95 % y de CO₂ al 5 % a 37 °C. El medio de cultivo se renovó cada 2 días hasta llegar a la confluencia celular en monocapa y las células se subcultivaron empleando tripsina al 0,25 %. Para realizar la exposición al líquido peritoneal las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 270.000 células/pocillo. Todos los experimentos se realizaron en cultivos confluentes tras el segundo pase.

Los cultivos de células estromales se trataron con medio de cultivo sin FBS durante 4 horas previo al experimento. Posteriormente, el medio de cultivo se suplementó con una mezcla de líquido peritoneal (a una concentración final de 0 %, 10 %, 25 %) procedente

de 10 mujeres con endometriosis o una mezcla de líquido peritoneal de 10 mujeres sin endometriosis, y las células se incubaron por otro periodo de 4 horas. Finalmente, los sobrenadantes de los cultivos celulares se distribuyeron en viales y se congelaron a -80 °C hasta su cuantificación proteica, al igual que los extractos de cultivos de células endometriales hasta la extracción de RNA. Todos los experimentos de cultivos de células endometriales procedentes de catorce mujeres con endometriosis y seis mujeres sin endometriosis se realizaron por triplicado.

3. 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows (*SPSS Inc.*, Chicago IL, EEUU) y se consideró estadísticamente significativo un nivel de $p < 0,05$.

Primero se comprobó si las variables cuantitativas analizadas seguían una distribución normal, mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar las medias de las variables cuantitativas con distribución normal se utilizó la prueba t de Student o la del ANOVA, según el número de grupos analizados. Cuando la prueba del ANOVA detectó diferencias significativas entre las medias, se aplicó la prueba de Bonferroni para establecer qué grupos presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí. En caso de no cumplir criterios de normalidad (niveles PAI-1), se aplicaron pruebas no paramétricas, como la U de Mann-Whitney o la de Kruskal-Wallis, según correspondiera por el número de grupos analizado.

La prueba t de Student para datos pareados y la prueba no paramétrica de Wilcoxon se utilizaron para comparar datos de pacientes en las cuales se obtuvo simultáneamente muestra de tejido endometriósico y endometrial.

Para el análisis de correlaciones entre dos variables, de las que al menos una tenía una distribución no normal, se aplicó el método de correlación de Pearson.

En los estudios de caso-control en los que se determinan los genotipos de los loci polimórficos, se comprobó la existencia del equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones de estudio (controles y endometriosis) al comparar las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas mediante un test chi-cuadrado (χ^2) con un grado de libertad (mediante MS Excel).

El número de muestras necesario para el estudio de cada uno de los polimorfismos se calculó por la fórmula de comparación de medias de grupos independientes con un contraste bilateral y fijando los errores tipo I y II en 5 % y 20 % respectivamente. Considerando la prevalencia media de la variable genética a determinar, el tamaño calculado de la muestra fue de 150 casos y 150 controles para los polimorfismos del PAI-

1 y de la MMP-3 y de 170 pacientes y 170 controles para el estudio de los polimorfismos del VEGF-A.

También se estudió la asociación entre un determinado genotipo o alelo y la enfermedad (endometriosis) mediante la prueba de independencia de χ^2 . Además, para cuantificar la magnitud de la asociación del polimorfismo con el riesgo de padecer endometriosis se calculó, para cada genotipo y alelo con respecto al de referencia, las *odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %.

En el caso del VEGF-A, en el que se estudian tres polimorfismos, también se evaluó la posible asociación de los haplotipos con la endometriosis. A partir de los genotipos de las poblaciones control y endometriosis, se infirieron los haplotipos y sus frecuencias mediante el software Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) [637].

El desequilibrio de ligamiento se analizó mediante el estadístico D' , que es la desviación entre la frecuencia haplotípica esperada (asumiendo que no existe ligamiento) y la observada ($D' = \frac{p_{12} - p_1 p_2}{\min(p_1, p_2)}$). Siendo p_1 y p_2 las probabilidades de los dos alelos y p_{12} la probabilidad observada para la pareja de alelos.

4.- RESULTADOS

“Si no puedo dibujarlo, es que no lo entiendo”.

Albert Einstein.

Los niveles proteicos y de mRNA de los diversos componentes de los sistemas fibrinolítico, de las MMPs y de la angiogénesis se determinaron en los distintos tipos de extractos tisulares estudiados (de endometrio de mujeres con y sin endometriosis y de endometrio de localización ectópica de las mujeres con endometriosis). Por otra parte, los niveles proteicos también se valoran en el líquido peritoneal de las mujeres con y sin endometriosis.

Durante el análisis de las muestras se observó que una cantidad significativa de los componentes estudiados (tanto del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas como de la angiogénesis) permanecían en el extracto de membrana de los diferentes tejidos estudiados. Por ello, la cuantificación proteica de dichos componentes se realizó tanto en los extractos de la fracción citosólica como en la fracción de membrana, expresándose los resultados como la suma de ambos niveles, normalizándose frente a la cantidad de proteína total.

Como el tejido endometrial está altamente influido por las hormonas esteroideas durante el ciclo menstrual, además de estudiar las diferencias de expresión entre los distintos tipos de tejido, también se realizó este estudio teniendo en cuenta la fase del ciclo menstrual. Por otra parte, también se comprobó la posible expresión diferencial en un mismo tejido a lo largo del ciclo menstrual.

Además para los ensayos con cultivos de células endometriales se evaluaron los niveles de mRNA en los extractos de los cultivos y los niveles proteicos en los sobrenadantes del cultivo tras el experimento.

4. 1. EXTRACTOS TISULARES

4. 1. 1. ENDOMETRIO EUTÓPICO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS FRENTE A ENDOMETRIO CONTROL

En relación a los activadores del sistema fibrinolítico y de las MMPs, el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis (estadios III–IV) mostró unos niveles superiores, tanto a nivel de mRNA ($P < 0,01$) como proteico ($P < 0,05$), de uPA y MMP-3 en comparación con el endometrio de las mujeres sin endometriosis (control) (Tabla 4.1).

Cuando se evaluaron los niveles de los inhibidores, PAI-1 y TIMP-1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los endometrios de mujeres con o sin endometriosis (Tabla 4.1).

Cuando se estudiaron estas diferencias en los activadores proteolíticos, en las distintas fases del ciclo menstrual, sólo se mantuvieron las diferencias significativas en la fase secretora (Tabla 4.2). En esta fase, al comparar el endometrio de las mujeres con endometriosis (estadios III–IV) frente al endometrio de las mujeres control, se detectaron unos niveles significativamente superiores, tanto a nivel de mRNA como proteico, de uPA ($P < 0,01$ y $P < 0,005$, respectivamente) y de MMP-3 ($P < 0,05$).

En relación a los inhibidores de la proteólisis, según la fase del ciclo menstrual, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PAI-1 entre los extractos de endometriales de mujeres con y sin endometriosis (Tabla 4.2). Sin embargo, los niveles proteicos de TIMP-1 fueron superiores en el endometrio de la mujer con endometriosis que en el control en la fase secretora ($P < 0,01$), no encontrándose diferencias significativas en la fase proliferativa (Tabla 4.2).

Tabla 4.1. Niveles de componentes de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles)

	<i>Endometrioma ovárico (estadios III-IV) (n= 71)</i>	<i>Endometrio eutópico de mujer con endometriosis (III-IV) (n= 40)</i>	<i>Endometrio de mujer sin endometriosis (Control) (n= 50)</i>	<i>ANOVA P</i>	<i>Endometrio eutópico vs. Endometrio control P</i>	<i>Endometrioma ovárico vs. Endometrio eutópico P</i>
uPA mRNA	0,334±0,034	0,532±0,006	0,381±0,003	< 0,005	< 0,01	NS
uPA prot (ng/mg)	2,0±0,2	2,8±0,5	1,7±0,2	< 0,05	< 0,05	NS
PAI-1 mRNA	1,747±0,198	0,355±0,002	0,156±0,057	< 0,001	NS	< 0,001
PAI-1 prot (ng/mg)	14,7±3,1	2,2±0,4	1,5±0,3	< 0,001	NS	< 0,001
MMP-3 mRNA	0,037±0,009	0,156±0,061	0,013±0,004	< 0,005	< 0,01	NS
MMP-3 prot (ng/mg)	3,46±0,43	4,70±0,80	2,65±0,36	< 0,05	< 0,05	NS
TIMP-1 mRNA	10,258±1,401	1,630±0,243	1,545±0,249	< 0,001	NS	< 0,001
TIMP-1 prot (ng/mg)	93±11	59±14	29±4	< 0,001	NS	< 0,001

Los datos se expresan como media ± error estándar medio. Los niveles de mRNA se representan normalizados frente a los niveles de β-actina (copias de mRNA del parámetro en estudio/copias de mRNA de β-actina) x 100. Los niveles de proteína están representados como la suma de los extractos citosólicos y de membrana (ng proteína/mg proteína total). NS, sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.2. Niveles de componentes de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles), según la fase del ciclo menstrual

	Endometrioma ovárico (estadios III-IV) (n= 71)		Endometrio eutópico de mujer con endometriosis (III-IV) (n= 40)		Endometrio de mujer sin endometriosis (Control) (n= 50)		Endometrio eutópico vs Control <i>P</i>		Endometrioma ovárico vs Endometrio eutópico <i>P</i>	
	<i>F. Prolif</i> (n= 33)	<i>F. Secret</i> (n= 38)	<i>F. Prolif</i> (n= 18)	<i>F. Secret</i> (n= 22)	<i>F. Prolif</i> (n= 23)	<i>F. Secret</i> (n= 27)	<i>F. Prolif</i>	<i>F. Secret</i>	<i>F. Prolif</i>	<i>F. Secret</i>
uPA mRNA	0,32±0,04	0,36±0,05	0,47±0,06	0,58±0,10	0,48±0,04	0,30±0,01	NS	< 0,01	< 0,05	< 0,05
uPA prot (ng/ mg)	2,0±0,3	2,0±0,2	2,1±0,4	3,4±0,7	1,7±0,2	1,8±0,2	NS	0,005	NS	NS
PAI-1 mRNA	2,15±0,49	1,23±0,19	0,20±0,07	0,50±0,16	0,12±0,03	0,13±0,04	NS	NS	0,001	< 0,05
PAI-1 prot (ng/ mg)	17,9±5,1	11,0±3,1	1,7±0,6	2,5±0,6	1,5±0,4	1,4±0,4	NS	NS	< 0,05	< 0,05
MMP-3 mRNA	0,026±0,006	0,048±0,013	0,078±0,058	0,225±0,091	0,018±0,006	0,006±0,002	NS	< 0,05	NS	< 0,05
MMP-3 prot (ng/ mg)	4,32±0,67	2,60±0,42	5,07±1,04	4,39±1,14	3,11±0,57	2,20±0,42	NS	< 0,05	NS	NS
TIMP-1 mRNA	10,02±1,99	10,51±1,99	1,19±0,23	2,03±0,39	1,59±0,34	1,51±0,36	NS	NS	0,001	0,005
TIMP-1 prot (ng/ mg)	72±8	112±16	58±22	60±11	31±8	28±4	NS	< 0,01	NS	< 0,05

Misma notación que Tabla 4.1

Cuando se evaluaron distintos componentes angiogénicos se observó que los extractos de endometrio eutópico de mujeres con endometriosis (estadios III-IV) mostraron unos niveles significativamente superiores de VEGF-A, tanto a nivel de mRNA ($10,803 \pm 1,107$ vs $6,395 \pm 0,538$, $P < 0,001$) como proteico (249 ± 43 vs 114 ± 13 ng/mg, $P < 0,05$) en comparación con el endometrio de las mujeres sin endometriosis (Tabla 4.3). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PIGF entre el endometrio de mujeres con y sin endometriosis (Tabla 4.3).

Los niveles del inhibidor de la angiogénesis, la TSP-1, tampoco mostraron diferencias significativas al comparar los extractos endometriales de los dos grupos estudiados (Tabla 4.3).

Al examinar la expresión del VEGF-A a lo largo del ciclo menstrual, en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis se detectaron, tanto en la fase proliferativa como en la secretora, unos niveles superiores de VEGF-A, tanto a nivel de mRNA ($P < 0,05$) como proteico (en fase proliferativa $P < 0,05$; en fase secretora $P < 0,01$) con respecto al endometrio de las mujeres control (Tabla 4.4).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ni en los niveles de PIGF ni de los de TSP-1 entre los endometrios de mujeres con y sin endometriosis, tanto en la fase proliferativa como en la secretora.

Tabla 4.3. Niveles de componentes de la angiogénesis en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles)

	<i>Endometrioma ovárico (estadios III-IV) (n= 71)</i>	<i>Endometrio eutópico de mujer con endometriosis (III-IV) (n= 40)</i>	<i>Endometrio de mujer sin endometriosis (Control) (n= 50)</i>	<i>ANOVA P</i>	<i>Endometrio eutópico vs. Endometrio control P</i>	<i>Endometrioma ovárico vs. Endometrio eutópico P</i>
VEGF-A mRNA	5,207±0,533	10,803±1,107	6,395±0,538	< 0,001	< 0,001	< 0,001
VEGF-A prot (pg/ mg)	83±14	249±43	114±13	< 0,001	< 0,05	< 0,001
PIGF mRNA	0,052±0,005	0,043±0,003	0,028±0,005	NS	NS	NS
PIGF prot (pg/ mg)	79±12	103±22	99±11	NS	NS	NS
TSP-1 mRNA	13,161±1,078	2,881±0,512	1,975±0,508	< 0,001	NS	< 0,001
TSP-1 prot (ng/ mg)	1541±154	352±38	277±27	< 0,001	NS	< 0,001

Los datos se expresan como media ± error estándar medio. Los niveles de mRNA se representan normalizados frente a los niveles de β-actina (copias de mRNA del parámetro en estudio/copias de mRNA de β-actina) x 100. Los niveles de proteína están representados como la suma de los extractos citosólicos y de membrana (pg o ng proteína/mg proteína total). NS, sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.4. Niveles de los componentes de la angiogénesis en extractos tisulares de endometrioma ovárico y endometrio de mujeres con y sin endometriosis (controles), por fase del ciclo menstrual

	Endometrioma ovárico (estadios III-IV) (n= 71)		Endometrio eutópico de mujer con endometriosis (III-IV) (n= 40)		Endometrio de mujer sin endometriosis (Control) (n= 50)		Endometrio eutópico vs Control <i>P</i>		Endometrioma ovárico vs Endometrio eutópico <i>P</i>	
	<i>F. Prolif</i> (n= 33)	<i>F. Secret</i> (n= 38)	<i>F. Prolif</i> (n= 18)	<i>F. Secret</i> (n= 22)	<i>F. Prolif</i> (n= 23)	<i>F. Secret</i> (n= 27)	<i>F. Prolif</i>	<i>F. Secret</i>	<i>F. Prolif</i>	<i>F. Secret</i>
VEGF-A mRNA	4,942±0,837	5,437±0,688	9,397±1,465	11,954±1,605	5,851±0,656	6,859±0,805	< 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01
VEGF-A prot (pg/ mg)	95±24	69±15	182±47	327±64	68±12	150±19	< 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,001
PIGF mRNA	0,058±0,007	0,049±0,004	0,050±0,017	0,037±0,016	0,032±0,009	0,024±0,004	NS	NS	NS	NS
PIGF prot (pg/ mg)	76±16	83±17	120±31	87±30	87±16	109±15	NS	NS	NS	NS
TSP-1 mRNA	12,976±1,734	13,322±1,361	2,621±0,735	3,093±0,7000	1,510±0,270	2,370±0,910	NS	NS	< 0,001	< 0,001
TSP-1 prot (ng/ mg)	1656±218	1395±253	313±46	413±63	210±27	317±42	NS	NS	< 0,001	< 0,001

Misma notación que Tabla 4.3.

4. 1. 2. ENDOMETRIOMA OVÁRICO EN ESTADIOS III-IV FRENTE A ENDOMETRIO EUTÓPICO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS

Los niveles de los activadores proteolíticos, uPA y MMP-3 resultaron ser ligeramente inferiores en los extractos de endometrioma ovárico frente a los extractos de endometrio de las mujeres con endometriosis (Tabla 4.1). Cuando se evaluaron estos resultados en relación a la fase del ciclo menstrual (Tabla 4.2), se observó una expresión significativamente inferior en los niveles de mRNA de uPA (en ambas fases del ciclo menstrual estudiadas) y MMP-3 (en la fase secretora del ciclo menstrual), en el extracto endometriósico con respecto al extracto endometrial de las mujeres con endometriosis ($P < 0,05$).

En relación a los inhibidores fibrinolíticos y de las MMPs, se observó un incremento significativo en los niveles de mRNA y proteicos, tanto de PAI-1 como de TIMP-1, en los extractos de tejido endometriósico con respecto a los extractos de tejido endometrial de las mujeres con y sin endometriosis ($P < 0,001$) (Tabla 4.1). Al distinguir por fase del ciclo menstrual (Tabla 4.2), se siguieron encontrando diferencias significativas, en el PAI-1 tanto a nivel de mRNA (en fase proliferativa $P = 0,001$; en fase secretora $P < 0,05$) como proteico ($P < 0,05$, en ambas fases del ciclo menstrual estudiadas), y en el TIMP-1 tanto a nivel de mRNA (en fase proliferativa $P < 0,001$; en fase secretora $P < 0,005$) como proteico (sólo en fase secretora $P < 0,05$).

En relación con la angiogénesis, también se observó una disminución en los niveles de VEGF-A, tanto a nivel de mRNA como proteico ($P < 0,001$), en los extractos endometriósicos con respecto a los endometriales de las mujeres con endometriosis (Tabla 4.3). Además, cuando se distinguió por la fase del ciclo menstrual (Tabla 4.4), se siguieron encontrando diferencias significativas en ambas fases del ciclo menstrual estudiadas, tanto a nivel de mRNA ($P < 0,01$) como proteico (en fase proliferativa $P < 0,05$; en fase secretora $P < 0,001$).

No se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de PIGF entre los diferentes extractos titulares estudiados (Tabla 4.3), como tampoco al diferenciar por la fase del ciclo menstrual (Tabla 4.4).

Con respecto a los inhibidores de la angiogénesis, se observó un incremento significativo en los niveles de TSP-1, a nivel de mRNA y proteína, en los extractos endometriósicos con respecto a los endometriales de las mujeres con endometriosis ($P < 0,001$). Al distinguir por la fase del ciclo menstrual (Tabla 4.4), se siguieron encontrando diferencias significativas, tanto a nivel de mRNA como proteico, en ambas fases del ciclo menstrual estudiadas ($P < 0,001$).

En un subgrupo de 40 pacientes se analizaron las muestras pareadas de endometrio eutéptico y endometrioma ovárico, ya que los datos pareados obtenidos de una misma paciente son fácilmente comparables y eliminan factores externos de confusión. En este subgrupo, se confirmaron los resultados obtenidos en el grupo total. En los extractos endometriósicos se observaron unos niveles inferiores de mRNA y proteína de uPA, MMP-3 (sólo a nivel de mRNA) y de VEGF-A que en los endometriales de las mujeres con endometriosis (mRNA de uPA $0,253 \pm 0,039$ vs $0,532 \pm 0,006$, $P < 0,001$; proteína de uPA $1,43 \pm 0,16$ vs $2,80 \pm 0,50$ ng/mg, $P < 0,01$; mRNA de MMP-3 $0,030 \pm 0,007$ vs $0,156 \pm 0,061$, $P < 0,05$; proteína de MMP-3 $3,63 \pm 0,54$ vs $4,70 \pm 0,80$ ng/mg, P no significativa; mRNA de VEGF-A $4,697 \pm 0,539$ vs $10,803 \pm 1,107$, $P < 0,001$; proteína de VEGF-A 82 ± 20 vs 249 ± 43 pg/mg, $P < 0,001$) (Figura 4.1a).

Con respecto a los inhibidores, en los extractos endometriósicos se observaron unos niveles superiores de mRNA y proteína de PAI-1, TIMP-1 y TSP-1 que en los endometriales de las mujeres con endometriosis (mRNA de PAI-1 $2,059 \pm 0,480$ vs $0,355 \pm 0,093$, $P < 0,01$; proteína de PAI-1 $13,01 \pm 2,98$ vs $2,13 \pm 0,43$ ng/mg, $P < 0,01$; mRNA de TIMP-1 $10,286 \pm 1,401$ vs $1,630 \pm 0,243$, $P < 0,01$; proteína de TIMP-1 93 ± 11 vs 59 ± 14 ng/mg, $P < 0,01$; mRNA de TSP-1 $15,570 \pm 2,298$ vs $2,881 \pm 0,512$, $P < 0,01$; proteína de TSP-1 1811 ± 185 vs 352 ± 38 ng/mg, $P < 0,01$) (Figura 4.1b).

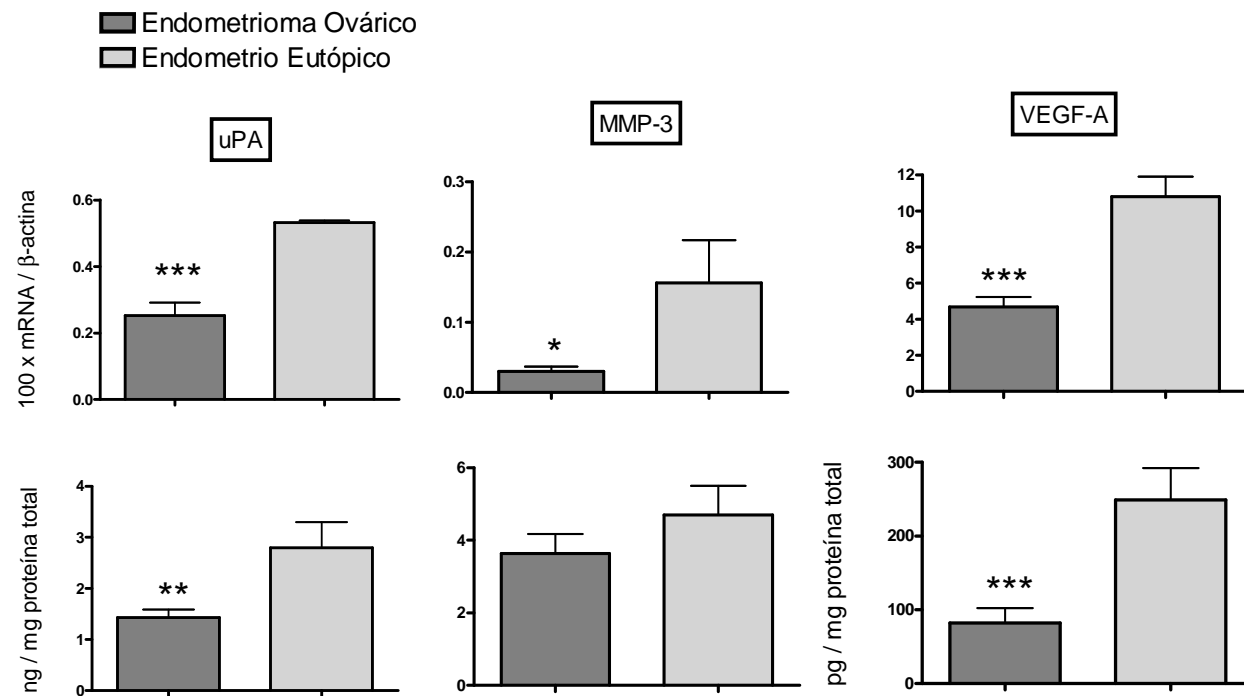


Figura 4.1a. Niveles de mRNA y proteicos de uPA, MMP-3 y VEGF-A en endometrio eutópico y ectópico (muestras pareadas) de mujeres con endometriosis. Datos expresados como media \pm error estándar medio. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

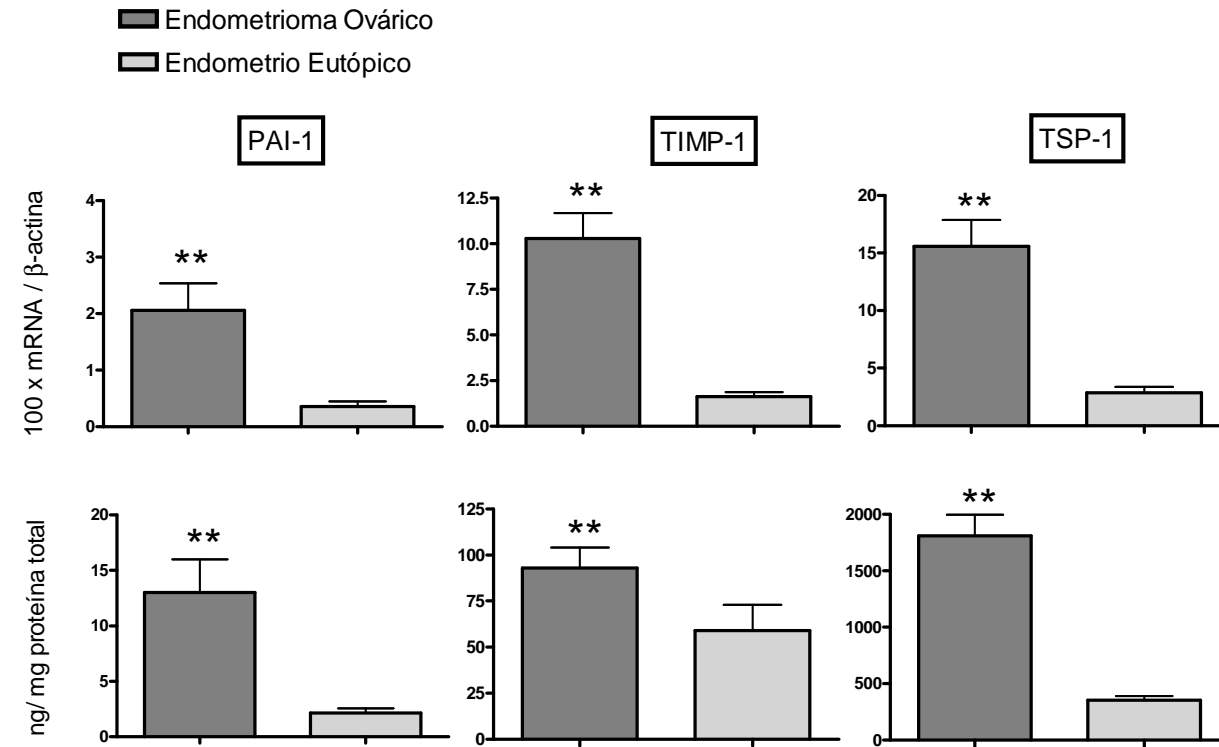


Figura 4.1b. Niveles de mRNA y proteicos de PAI-1, TIMP-1 y TSP-1 en endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis. Datos expresados como media ± error estándar medio. **P < 0,01.

4. 1. 3. ENDOMETRIO EUTÓPICO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS EN ESTADIOS III-IV FRENTE A ESTADIOS I-II Y ENDOMETRIOMA OVÁRICO (ESTADIOS III-IV) FRENTE A IMPLANTE PERITONEAL (ESTADIOS I-II)

Con respecto al tejido endometrial de localización eutópica, se observó una mayor expresión, en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis en estadios III-IV (n= 40) que en el endometrio de las mujeres con estadios I-II (n= 13), sólo a nivel de mRNA de VEGF-A ($10,80\pm 1,11$ vs $6,32\pm 1,13$ pg/mg, $P < 0,05$) y PlGF ($0,043\pm 0,003$ vs $0,012\pm 0,003$ pg/mg, $P < 0,01$).

Con respecto al tejido endometrial de localización ectópica (tejido endometriósico), se encontró, a nivel de mRNA, una menor expresión de uPA y una mayor expresión de PAI-1 en los endometriomas ováricos (en estadios III-IV, n= 71) que en las lesiones peritoneales endometriósicas (en estadios I-II, n= 13) (uPA: $0,334\pm 0,034$ vs $0,751\pm 0,261$, $P = 0,002$; PAI-1: $1,747\pm 0,198$ vs $0,430\pm 0,180$, $P = 0,016$). También se observó esta misma tendencia, no significativa, en los niveles proteicos de PAI-1 ($14,72\pm 3,07$ vs $2,27\pm 1,16$ ng/mg, $P = 0,089$).

Además, también se apreció una menor actividad angiogénica en los endometriomas ováricos frente a los implantes endometriósicos (niveles proteicos VEGF-A; 83 ± 14 vs 373 ± 168 pg/mg, $P < 0,001$).

Tabla 4.5. Niveles de componentes de los sistemas fibrinolítico, de las MMPs y de la angiogénesis en extractos tisulares de lesiones endometriósicas, según el estadio de la enfermedad.

	<i>Endometrioma ovárico (estadios III-IV) (n= 71)</i>	<i>Implantes peritoneales (estadios I-II) (n= 13)</i>	<i>Significación estadística P</i>
uPA mRNA	0,334±0,034	0,751±0,261	0,002
uPA prot (ng/mg)	2,01±0,22	2,08±0,35	NS
PAI-1 mRNA	1,747±0,198	0,430±0,180	0,016
PAI-1 prot (ng/mg)	14,72±3,07	2,27±0,90	NS
MMP-3 mRNA	0,037±0,009	0,016±0,012	NS
MMP-3 prot (ng/mg)	3,46±0,43	2,60±0,38	NS
TIMP-1 mRNA	10,286±1,401	2,798±0,121	NS
TIMP-1 prot (ng/mg)	93±11	91±23	NS
VEGF-A mRNA	5,207±0,533	7,204±1,297	NS
VEGF-A prot (pg/mg)	83±14	373±168	< 0,001
PIGF mRNA	0,052±0,005	0,053±0,023	NS
PIGF prot (pg/mg)	79±12	128±21	NS
TSP-1 mRNA	13,161±1,078	8,843±4,100	NS
TSP-1 (ng/mg)	1541±154	934±143	NS

Los datos se expresan como media \pm error estándar medio. Los niveles de mRNA se representan normalizados frente a los niveles de β -actina (copias de mRNA del parámetro estudiado/copias de mRNA de β -actina) \times 100. Los niveles de proteína están representados como la suma de los extractos citosólicos y de membrana (pg o ng proteína/ mg proteína total). NS, sin diferencias estadísticamente significativas.

4. 1. 4. EXTRACTOS TISULARES A LO LARGO DEL CICLO MENSTRUAL

Endometrio de mujeres control

En el endometrio de las mujeres sin endometriosis se observaron niveles de mRNA de uPA significativamente más elevados en la fase proliferativa frente a la secretora. (Tabla 4.2) Aunque el resto de parámetros estudiados no mostraron diferencias significativas, los niveles de MMP-3 siguieron la misma tendencia.

Con respecto a los componentes de la angiogénesis estudiados, en el endometrio control se observó una menor expresión de VEGF-A y TSP-1, a nivel proteico, en las fase del ciclo proliferativa frente a la secretora ($P < 0,001$ y $P < 0,05$, respectivamente), aunque las diferencias no fueron significativas a nivel de mRNA (Tabla 4.4).

Endometrio eutópico de mujeres con endometriosis (en estadios III-IV)

En el endometrio de las mujeres con endometriosis se observó una menor expresión de uPA y PAI-1, a nivel proteico, en la fase del ciclo proliferativa con respecto a la secretora ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente). El resto de parámetros estudiados no mostraron diferencias significativas. (Tabla 4.2)

Con respecto a los componentes implicados en la angiogénesis, en el endometrio de las mujeres con endometriosis, no se apreciaron diferencias significativas del VEGF-A, ni a nivel de mRNA ni proteico. Tampoco se encontraron diferencias significativas del PIGF o la TSP-1 entre las fases del ciclo menstrual estudiadas, ni a nivel de mRNA ni proteico.

Endometrioma ovárico de mujeres con endometriosis

En endometrioma ovárico se observó una mayor expresión de PAI-1, a nivel proteico, en la fase del ciclo proliferativa con respecto a la secretora ($P < 0,05$). El resto de parámetros estudiados no mostraron diferencias significativas (Tabla 4.2).

Con respecto a los componentes implicados en la angiogénesis, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas por la fase del ciclo menstrual.

4. 1. 5. CORRELACIÓN ENTRE COMPONENTES DE LA ANGIOGÉNESIS Y DE LOS SISTEMAS FIBRINOLÍTICO Y DE LAS MMPS

En los endometrios de las mujeres sin endometriosis, se observó una correlación significativa entre los niveles proteicos de VEGF-A con los niveles de uPA, por una parte, y con los de MMP-3 por otra ($r = 0,552$, $P < 0,001$ y $r = 0,329$, $P < 0,05$,

respectivamente) (Figura 4.2). A nivel de mRNA se observó una correlación positiva entre los niveles de TSP-1 y TIMP-1 ($r= 0,552, P< 0,05$).

En los endometrios de las mujeres con endometriosis se observó una correlación significativa entre los niveles de uPA y MMP-3, a nivel de mRNA y proteína, ($r= 0,581, P< 0,001$ y $r= 0,454, P< 0,05$, respectivamente) y además, a nivel de mRNA entre los niveles de uPA y PAI-1 ($r= 0,412, P< 0,01$), los niveles de VEGF-A y TSP-1 ($r= 0,577, P< 0,001$) y los niveles de PAI-1 y TSP-1 ($r= 0,670, P< 0,001$). En el endometrioma ovárico, existía una correlación significativa entre los niveles proteicos de uPA con los niveles de VEGF-A, por una parte, y con los de PAI-1 por otra ($r= 0,410, P< 0,01$ y $r= 0,359, P< 0,05$, respectivamente). Y también entre los niveles proteicos de PAI-1 y TSP-1 ($r= 0,354, P< 0,05$).

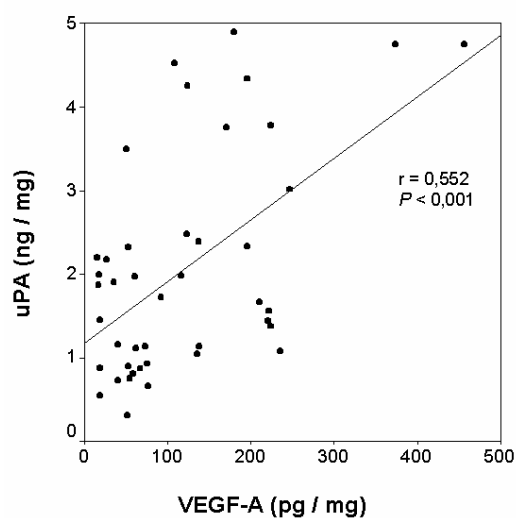


Figura 4.2. Correlación entre los niveles proteicos de VEGF-A frente a los de uPA, en extracto de tejido endometrial de mujeres control.

En cuanto a las correlaciones entre los niveles de mRNA con respecto a los proteicos, en endometrio de las mujeres control no se observa correlación significativa en los parámetros estudiados. Sin embargo, en el endometrio de las mujeres con endometriosis se observa una correlación positiva en los niveles de PAI-1 ($r= 0,688, P< 0,001$) y en el endometrioma ovárico en los niveles de uPA ($r= 0,539, P< 0,001$).

4. 2. LÍQUIDO PERITONEAL

La Tabla 4.6 muestra los niveles de los distintos parámetros determinados en el líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis. La concentración de proteína total en el líquido peritoneal fue similar en mujeres con (n= 53) y sin endometriosis (n= 35).

Tabla 4.6. Niveles proteicos de diversos componentes de los sistemas fibrinolítico, de las MMPs y de la angiogénesis, en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis (controles)

	<i>Líquido peritoneal de mujer con endometriosis (estadios III-IV) (n= 53)</i>	<i>Líquido peritoneal de mujer control (n= 35)</i>	<i>Significación estadística P</i>
Prot total (mg/ml)	42,9±2,8	41±3	NS
uPA (ng/ml)	1,76±0,15	1,24±0,08	< 0,05
PAI-1 (ng/ml)	25,4±3,9	18±4	NS
MMP-3 (ng/ml)	51,2±5,2	32±5	< 0,05
TIMP-1 (ng/ml)	943±97	664±109	NS
VEGF-A (pg/ml)	317±50	184±30	< 0,05
PIGF (pg/ml)	358±54	310±35	NS
TSP-1 (ng/ml)	197±19	145±17	NS

Los datos se expresan como media ± error estándar medio. NS, sin diferencias estadísticamente significativas.

En el líquido peritoneal, los niveles de uPA, MMP-3 y VEGF-A eran significativamente mayores en las mujeres con endometriosis que en las mujeres sin endometriosis (uPA: 1,76±0,15 vs 1,24±0,08 ng/ml; MMP-3: 51,2±5,2 vs 32,4±5,2 ng/ml; VEGF-A: 317±50 vs 184±30 pg/ml, $P < 0,05$) (Tabla 4.6.) No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles proteicos de PAI-1, TIMP-1, PIGF ni TSP-1, entre los líquidos peritoneales de las mujeres con y sin endometriosis.

No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles proteicos de los componentes estudiados entre las mujeres con endometriosis con estadios III-IV (n= 53) y aquellas con estadios I-II (n= 13).

En relación a las correlaciones entre los parámetros estudiados en líquido peritoneal, no se observa ninguna correlación significativa en el grupo control, mientras que en las mujeres con endometriosis se observa una correlación entre los niveles proteicos de VEGF-A y uPA ($r= 0,381$, $P < 0,01$).

4. 3. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS EN MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS. RELACIÓN CON LOS NIVELES DE LOS COMPONENTES ESTUDIADOS EN TEJIDO Y LÍQUIDO PERITONEAL

El estudio de los polimorfismos genéticos permite identificar que genes pueden dar mayor (o menor) susceptibilidad a desarrollar una enfermedad. Así pues, la presencia en un individuo de un determinado genotipo o alelo (o combinaciones) es considerado como un factor de riesgo (o protección) para padecer una enfermedad. En nuestro caso estudiamos estos polimorfismos en mujeres con y sin endometriosis, no relacionadas entre sí (estudio de caso-control). En estos grupos se estimaron las frecuencias genotípicas y alélicas y se comprobó si cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se comprobó si hay diferencias en estas frecuencias genotípicas y alélicas entre las mujeres con y sin endometriosis, es decir, si el polimorfismo de estudio es un factor de riesgo (o de protección). Además se cuantificó la magnitud del riesgo calculando el *odds ratio* (OR).

4. 3. 1. POLIMORFISMO -675 4G/5G DEL GEN DEL PAI-1 (rs1799768)

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1

Para determinar el papel del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 en la endometriosis, evaluamos este polimorfismo en 186 mujeres con endometriosis y 220 mujeres sin endometriosis (grupo control). Ambas poblaciones se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo no mostraron diferencias significativas entre pacientes con endometriosis y mujeres control (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 en mujeres con y sin endometriosis

	<i>Mujeres con endometriosis</i> (n=186)		<i>Mujeres sin endometriosis</i> (n = 220)		<i>OR (IC 95%)</i>
	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	
Genotipos;					
5G5G	44	0,237	66	0,300	1*
4G5G	106	0,570	108	0,491	1,47 (0,92-2,35)
4G4G	36	0,193	46	0,209	1,17 (0,66-2,10)
Presencia 4G	142	0,763	154	0,700	1,38 (0,89-2,16)
Alelos;					
5G	194	0,522	240	0,555	1*
4G	178	0,478	200	0,455	1,10 (0,83-1,45)
H-W (χ^2):	3,745		0,021		

* Grupo de referencia. H-W (χ^2): Valor de chi-cuadrado, con 1 grado de libertad se acepta que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg cuando el valor es inferior a 3,841 ($p > 0,05$).

De las pacientes con endometriosis, 167 presentaban estadios III-IV de la enfermedad y las 19 restantes tenían estadios I-II. Tanto la población con endometriosis III-IV como la de endometriosis I-II estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Cuando, dentro del grupo de mujeres con endometriosis, se comparó la frecuencia genotípica y alélica de este polimorfismo por estadio de la enfermedad, no se encontraron diferencias significativas.

Niveles de PAI-1 en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis según el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1

Aunque tanto los niveles de mRNA como los proteicos de PAI-1 en tejido endometrial eran mayores en el grupo de las mujeres con endometriosis (pacientes, n=50) que en el de las mujeres sin endometriosis (controles, n= 46), estas diferencias no fueron significativas (Figura 4.3a).

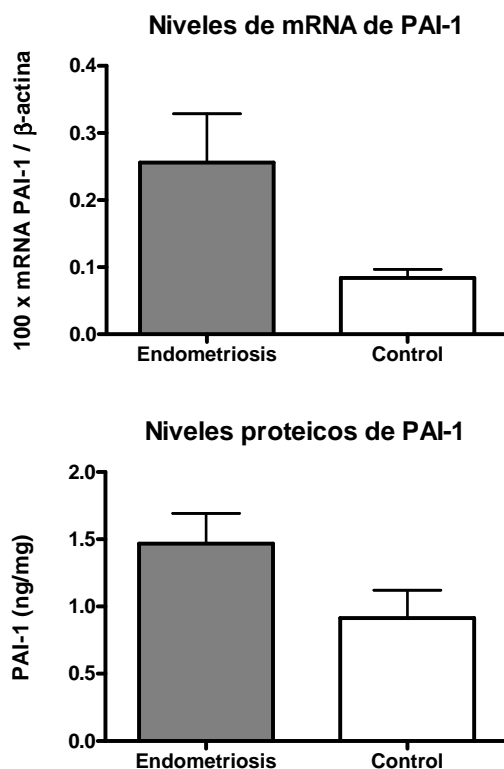


Figura 4.3a. Niveles de PAI-1 (mRNA y proteína) en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis (control). Datos expresados como media \pm error estándar medio. Niveles de significación mediante la prueba de Mann-Whitney para mRNA ($P= 0,063$) y proteína ($P= 0,095$).

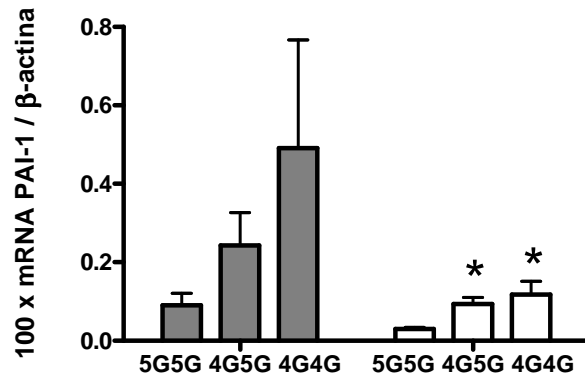
También se estudió si el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 es capaz de modular los niveles tisulares de PAI-1, tanto a nivel de mRNA como proteico, para lo que se cuantificaron estos niveles en endometrio de mujeres con y sin endometriosis (Figura 4.3b).

En el endometrio de las mujeres sin endometriosis (control) se observó que los niveles de PAI-1, tanto de mRNA como de proteína, se incrementaban al aumentar el número de alelos 4G (Kruskal-Wallis: $P= 0,011$ y $P= 0,038$, respectivamente). Así, las mujeres control con genotipo 4G4G ($n= 13$) tenían niveles de PAI-1 mayores que con genotipo 5G5G ($n= 13$), a nivel de mRNA (0,087 vs 0,030, $P= 0,014$) y proteico (1,96 vs

0,21 ng/mg, $P= 0,026$), incluso las mujeres con genotipo 4G5G ($n= 20$) tenían unos niveles de mRNA de PAI-1 mayores a los de las mujeres con genotipo 5G5G (0,067 vs 0,030, $P= 0,005$) (Figura 4.3b). Es más, el grupo de mujeres sin endometriosis portadoras del alelo 4G (con genotipos 4G4G y 4G5G, $n= 33$) también tenían niveles de PAI-1 mayores que las no portadoras del alelo 4G (con genotipo 5G5G, $n= 13$) a nivel de mRNA (0,074 vs 0,030, $P= 0,003$) y proteico (0,50 vs 0,21 ng/mg, $P= 0,047$) (Figura 4.3c).

En el endometrio de las mujeres con endometriosis se observó la misma tendencia (a nivel de mRNA y proteína), aunque no significativa, que en las mujeres sin endometriosis (Kruskal-Wallis: $P= 0,517$ y $P= 0,321$, respectivamente). Así, las mujeres con endometriosis y con genotipo 4G4G ($n= 10$) o con genotipo 4G5G ($n= 28$) tenían niveles de PAI-1 mayores que con genotipo 5G5G ($n= 12$) (Figura 4.3b). También se encontró esta misma tendencia, no significativa, en el grupo de mujeres con endometriosis portadoras del alelo 4G (con genotipos 4G4G y 4G5G, $n= 38$) que tenían niveles de PAI-1 mayores que las no portadoras del alelo 4G (con genotipo 5G5G, $n= 12$) (Figura 4.3c).

Niveles de mRNA de PAI-1



Niveles proteicos de PAI-1

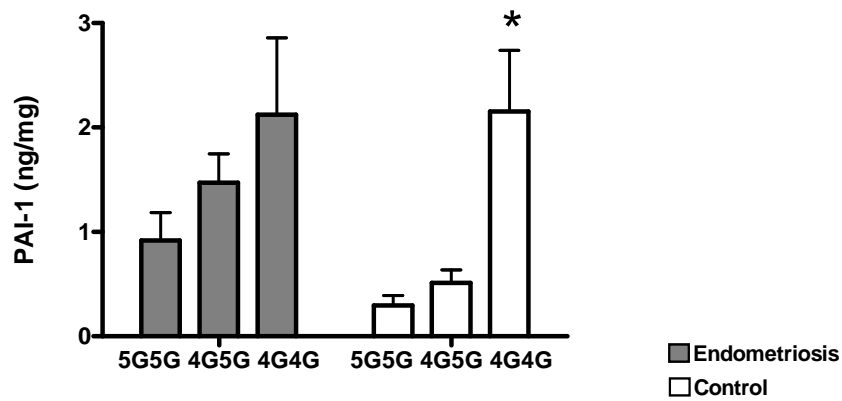


Figura 4.3b. Niveles de mRNA y proteicos de PAI-1 en tejido endometrial, de acuerdo con el genotipo del polimorfismo 4G/5G del promotor del gen PAI-1, en mujeres con y sin endometriosis. Kruskal-Wallis para los niveles de mRNA y de proteína en mujeres sin endometriosis (controles) ($P= 0,011$ y $P= 0,038$, respectivamente) y para las mujeres con endometriosis ($P= 0,517$ y $P= 0,321$, respectivamente). Niveles de significación frente a los niveles del genotipo 5G5G de su grupo correspondiente (control y endometriosis) mediante la prueba de Mann-Whitney: $*P < 0,05$.

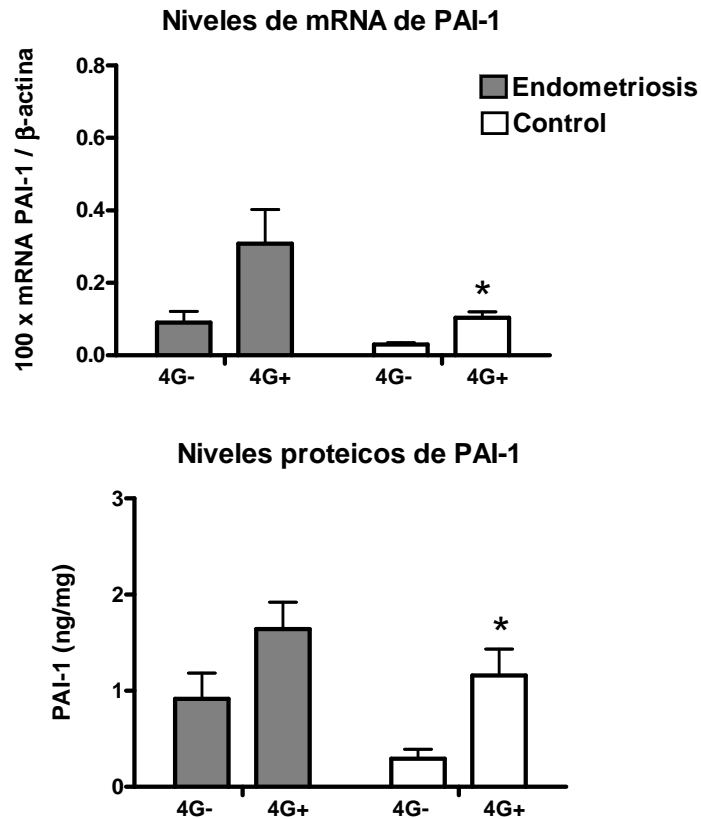


Figura 4.3c. Niveles de mRNA y proteicos de PAI-1 en tejido endometrial, de acuerdo con la presencia (4G+) o ausencia (4G-) del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del promotor del gen PAI-1, en mujeres con y sin endometriosis. Niveles de significación frente a los niveles del genotipo 5G5G de su grupo correspondiente (control y endometriosis) mediante la prueba de Mann-Whitney: * $P < 0,05$.

Niveles de PAI-1 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis según el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1

En el líquido peritoneal, los niveles proteicos de PAI-1 fueron significativamente superiores en pacientes (n= 67) que en controles (n= 30) ($P= 0,003$) (Figura 4.4). Con el fin de evaluar si el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 modula los niveles proteicos de PAI-1 en el líquido peritoneal, agrupamos a las mujeres control y a las pacientes de

acuerdo con su genotipo (4G4G: n= 12 y n= 12; 4G5G: n= 12 y n= 39; 5G5G: n= 6 y n= 16, respectivamente). No se observó diferencias significativas en dichos niveles, al distinguir por genotipo, entre los líquidos peritoneales de las mujeres control (Kruskal-Wallis: $P= 0,075$), ni tampoco entre los líquidos peritoneales de las mujeres con endometriosis (Kruskal-Wallis: $P= 0,385$) (Figura 4.4)

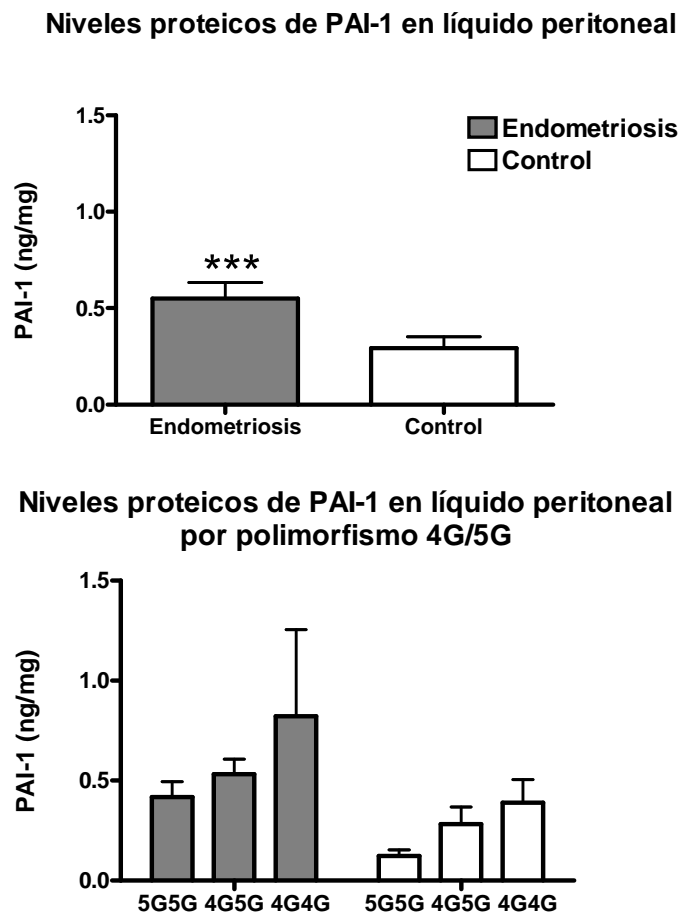


Figura 4.4. Niveles proteicos de PAI-1 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis. En la gráfica superior se muestran los niveles de ambos grupos sin agrupar por genotipo, mientras que en la inferior los niveles aparecen de acuerdo con el genotipo del polimorfismo 4G/5G del promotor del gen del PAI-1. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Se realizó una prueba de Mann-Whitney para los niveles de proteína entre mujeres con y sin endometriosis (Niveles de significación; *** $P < 0,005$). Kruskal-Wallis para los niveles de proteína por genotipo en mujeres sin endometriosis (controles) y para las mujeres con endometriosis ($P= 0,075$ y $P= 0,385$, respectivamente).

4. 3. 2. POLIMORFISMO -1612 5A/6A DEL GEN DE LA MMP-3 (rs3025058)

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 5A/6A de la MMP-3

Para determinar el papel del polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 en la endometriosis, se evaluó este polimorfismo en 153 (de las 186) mujeres con endometriosis y 202 (de las 220) mujeres control. Las poblaciones control y endometriosis estudiadas no estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Aún así, se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo entre mujeres con endometriosis y controles no obteniéndose diferencias significativas entre los grupos estudiados (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 en mujeres con y sin endometriosis.

	<i>Mujeres con endometriosis (n=153)</i>		<i>Mujeres sin endometriosis (n = 202)</i>		<i>OR (IC 95%)</i>
	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	
Genotipos;					
6A6A	37	0,242	64	0,317	1*
5A6A	98	0,640	115	0,569	1,47 (0,91-2,40)
5A5A	18	0,118	23	0,114	1,35 (0,65-2,83)
Presencia 5A	116	0,758	138	0,683	1,45 (0,90-2,34)
Alelos;					
6A	172	0,562	243	0,601	1*
5A	134	0,438	161	0,399	1,18 (0,87-1,54)
H-W (χ^2):		13,872		7,104	

* Grupo de referencia. H-W (χ^2): Valor de chi-cuadrado, con 1 grado de libertad se acepta que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg cuando el valor es inferior a 3,841 ($p > 0,05$).

De las 153 mujeres con endometriosis incluidas en el estudio, 139 estaban en un estadio III-IV de la enfermedad y las 14 restantes en estadio I-II. Al comparar las

frecuencias genóticas entre mujeres con estadios III-IV con aquellas con estadios I-II, no se encontraron diferencias significativas.

Niveles de MMP-3 en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis de acuerdo con el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3

El endometrio de las mujeres con endometriosis (n= 25) mostró unos niveles superiores de MMP-3 a nivel de mRNA, pero no de proteína, frente al endometrio de las mujeres control (n= 33) (Figura 4.5a).

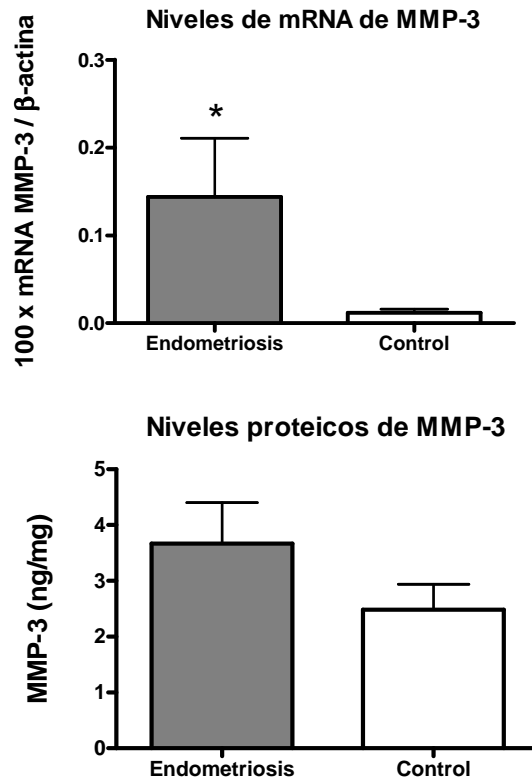


Figura 4.5a. Niveles de mRNA y proteicos de MMP-3 en tejido endometrial en mujeres con y sin endometriosis. Datos expresados como media ± error estándar medio. Mann-Whitney para los niveles de mRNA (P= 0,019) y de proteína (P=0,164). *P< 0,05.

También se analizó si el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 era capaz de modular los niveles tisulares de MMP-3, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en el endometrio de mujeres con y sin endometriosis (Figura 4.5b). De esta forma agrupamos a las mujeres control y a las pacientes de acuerdo con su genotipo (6A6A: n= 10 y n= 6; 5A6A: n= 17 y n= 19; 5A5A: n= 6 y n= 0, respectivamente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas, al distinguir por genotipo, en los niveles de mRNA y proteína de la MMP-3 ni en el grupo de mujeres sin endometriosis (grupo control, Kruskal-Wallis: $P= 0,866$ y $P= 0,269$, respectivamente) ni en el de mujeres con endometriosis (pacientes, Mann-Whitney: $P= 0,899$ y $P= 0,899$, respectivamente).

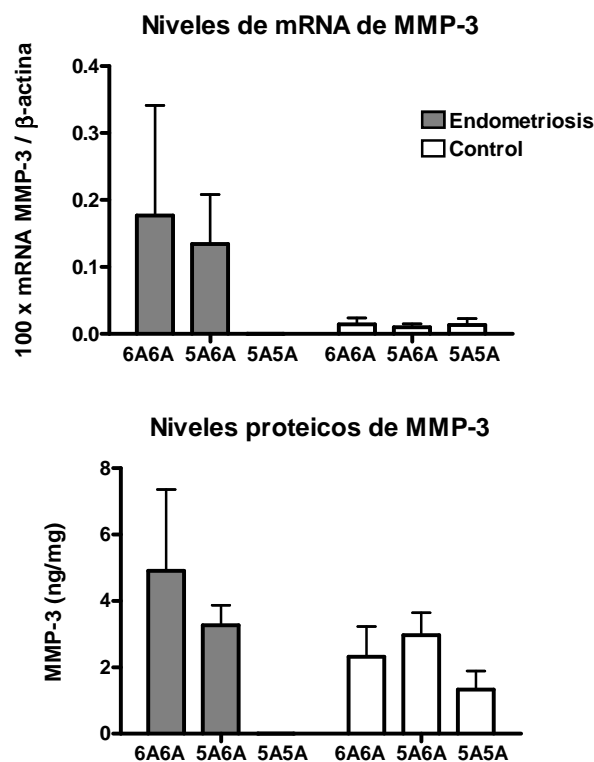


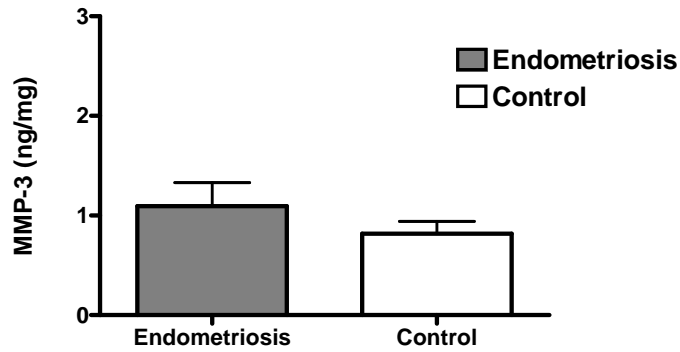
Figura 4.5b. Niveles de mRNA y proteicos de MMP-3 en tejido endometrial, de acuerdo con el genotipo del polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3, de mujeres con y sin endometriosis. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Kruskal-Wallis para los niveles de mRNA y proteína por genotipo en mujeres sin endometriosis (controles) ($P= 0,866$ y $P= 0,269$, respectivamente) y Mann-Whitney para las mujeres con endometriosis ($P= 0,899$ y $P= 0,899$, respectivamente).

Niveles de MMP-3 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis de acuerdo con el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3

El nivel proteico de MMP-3 era mayor en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (n= 37) que en el del mujeres sin endometriosis (n= 26) (Mann-Whitney: $P= 0,994$).

También se analizó si el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 modula los niveles proteicos de MMP-3 en el líquido peritoneal. No se observaron diferencias significativas en los niveles de MMP-3 del líquido peritoneal entre los 3 genotipos, ni en el grupo de mujeres sin endometriosis (6A6A $1,059\pm 0,405$, n= 7 ; 5A6A $0,911\pm 0,251$, n= 14; 5A5A $0,372\pm 0,045$ ng/mg, n= 5, Kruskal-Wallis: $P= 0,545$) ni en el de mujeres con endometriosis (6A6A $0,906\pm 0,245$, n= 10; 5A6A $1,376\pm 0,534$, n= 18; 5A5A $0,552\pm 0,138$ ng/mg, n= 9, Kruskal-Wallis: $P= 0,430$) (Figura 4.6).

Niveles proteicos de MMP-3 en líquido peritoneal



Niveles proteicos de MMP-3 en líquido peritoneal por polimorfismo 5A/6A

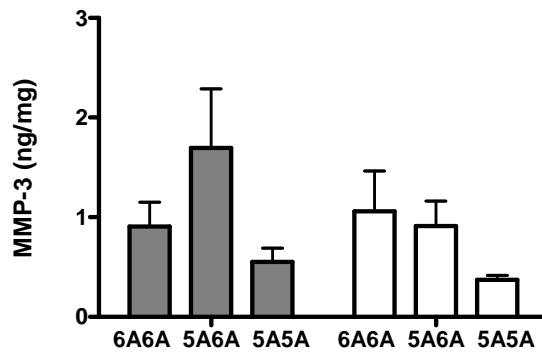


Figura 4.6. Niveles proteicos de MMP-3 en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis. En la gráfica superior se muestra los niveles de los dos grupos sin agrupar por genotipos, mientras que en la inferior los niveles aparecen de acuerdo con el genotipo del polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Mann-Whitney para los niveles proteicos de MMP-3 sin atender al genotipo ($P=0,994$). Kruskal-Wallis para los niveles de proteína por genotipo en mujeres sin endometriosis (controles) ($P=0,545$) y para las mujeres con endometriosis ($P=0,430$).

4. 3. 3. POLIMORFISMOS -460C/T (rs833061), +405G/C (rs2010963) y 936C/T (rs3025039) DEL GEN DEL VEGF-A

Frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos del VEGF-A

Para determinar el papel de estos tres polimorfismos en la endometriosis, se genotiparon 186 mujeres con endometriosis y 220 mujeres sin endometriosis (control). Para estos tres polimorfismos tanto la población control como la de endometriosis estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos -460C/T y +405G/C no diferían entre las mujeres con y sin endometriosis (Tablas 4.9 y 4.10).

Tabla 4.9. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo -460C/T del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis

	<i>Mujeres con endometriosis (n=186)</i>		<i>Mujeres sin endometriosis (n = 220)</i>		<i>OR (IC 95%)</i>
	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	
Genotipos;					
-460CC	39	0,210	57	0,259	1*
-460CT	97	0,521	104	0,473	1,36 (0,83-2,23)
-460TT	50	0,269	59	0,268	1,24 (0,71-2,16)
Presencia -460T	147	0,790	163	0,741	1,32 (0,83-2,10)
Alelos;					
-460C	175	0,470	218	0,495	1*
-460T	197	0,530	222	0,505	1,11 (0,84-1,46)
H-W (χ^2):		0,405		0,653	

* Grupo de referencia. H-W (χ^2): Valor de chi-cuadrado, con 1 grado de libertad se acepta que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg cuando el valor es inferior a 3,841 ($p > 0,05$).

Tabla 4.10. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo +405G/C del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis

	<i>Mujeres con endometriosis</i>		<i>Mujeres sin endometriosis</i>		<i>OR (IC 95%)</i>
	<i>(n=186)</i>		<i>(n = 220)</i>		
	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	
Genotipos;					
+405GG	77	0,416	103	0,470	1*
+405GC	91	0,489	97	0,438	1,26 (0,83-1,89)
+405CC	18	0,095	20	0,092	1,20 (0,60-2,43)
Presencia +405C	109	0,584	117	0,530	1,25 (0,84-1,85)
Alelos;					
+405G	245	0,659	229	0,689	1*
+405C	127	0,341	135	0,311	1,15 (0,85-1,54)
H-W (χ^2):	1,439		0,174		

* Grupo de referencia. H-W (χ^2): Valor de chi-cuadrado, con 1 grado de libertad se acepta que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg cuando el valor es inferior a 3,841 ($p > 0,05$).

Sin embargo, las mujeres con endometriosis mostraron una mayor frecuencia del alelo 936T que las mujeres control ($P= 0,015$) (Tabla 4.11). Además, también se observó una diferencia significativa entre la frecuencia del alelo 936T del gen del VEGF-A en el subgrupo de 167 mujeres con endometriosis en estadios III-IV con respecto al grupo de 220 mujeres sin endometriosis (grupo control) ($P= 0,02$).

Tanto el grupo de 167 pacientes con estadios III-IV como el de 19 pacientes con estadios I-II estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los polimorfismos del VEGF-A estudiados, excepto la pequeña población de endometriosis con estadios I-II ($n=19$) para el polimorfismo -460GC.

Cuando se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas de los tres polimorfismos del gen del VEGF-A estudiados, dentro del grupo de mujeres con endometriosis, de acuerdo con el estadio de la enfermedad, no se observó diferencias

significativas entre los subgrupos de pacientes con estadio I-II y aquellas con estadio III-IV.

Tabla 4.11. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 936C/T del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis

	<i>Mujeres con endometriosis</i>		<i>Mujeres sin endometriosis</i>		<i>OR (IC 95%)</i>
	<i>(n=186)</i>		<i>(n = 220)</i>		
	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	
Genotipos;					
936CC	132	0,710	177	0,804	1*
936CT	49	0,263	42	0,191	1,56 (0,98-2,50)
936TT	5	0,027	1	0,005	6,71 (0,77-58,1)
Presencia 936T	54	0,290	43	0,196	1,68 (1,06-2,67)
Alelos;					
936C	313	0,841	396	0,900	1*
936T	59	0,159	44	0,100	1,70 (1,12-2,58)
H-W (χ^2):		0,031		0,808	

* Grupo de referencia. H-W (χ^2): Valor de chi-cuadrado, con 1 grado de libertad se acepta que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg cuando el valor es inferior a 3,841 ($p > 0,05$).

Se estimó el valor de desequilibrio de ligamiento (D') entre pares de SNPs mediante el software Haploview (Figura 4.7). Se observó la existencia de desequilibrio de ligamiento, tanto en el grupo de mujeres sin endometriosis (control) como en el de mujeres con endometriosis, entre los polimorfismos -460C/T (rs833061) y +405G/C (rs2010963) ($D' = 0,84$, en control), pero no entre -460C/T y 936C/T (rs3025039) ($D' = 0,24$, en control) ni entre +405G/C y 936C/T ($D' = 0,26$, en control) (Figura 4.7). Por ello, se realizó un análisis por haplotipo de los polimorfismos -460C/T y +405G/C. Se estudiaron las frecuencias de los cuatro haplotipos resultantes y no se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles (Tabla 4.12).

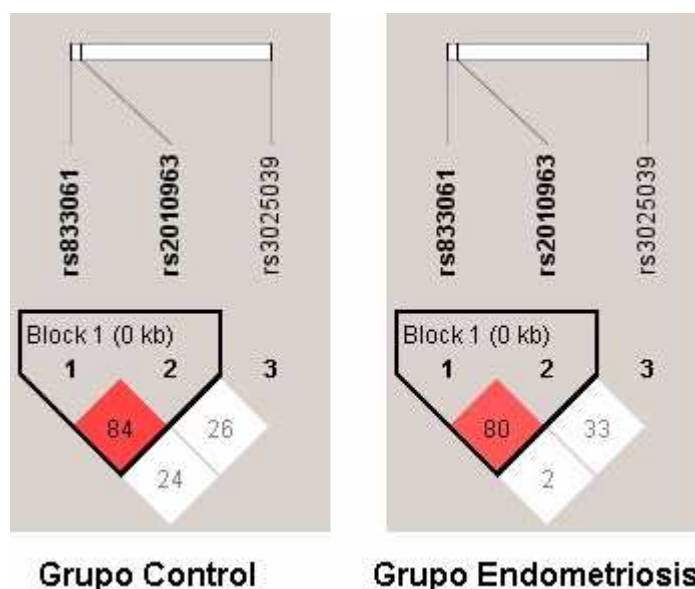


Figura 4.7. Diagrama de desequilibrio de ligamiento de los tres polimorfismos estudiados en el gen del VEGF-A. Los números en el interior de los rombos indican el valor de D' (en porcentaje). En ambos grupos (control y endometriosis) observamos que los polimorfismos -460 (1) y +405 (2) están fuertemente ligados formando un bloque (indicado mediante el color rojo en el rombo entre ambos polimorfismos). La asignación de bloque se realizó mediante el método “solid spine” del programa Haploview, considerando un valor umbral de $D' > 0,8$.

Tabla 4.12. Frecuencia haplotípica del gen del VEGF-A en mujeres con y sin endometriosis.

Haplotipo del VEGF-A -460/+405	Mujeres con endometriosis (n=372)		Mujeres sin endometriosis (n=440)		OR (IC 95%)
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	
Haplotipo:					
C/G	163	0,438	208	0,473	1*
C/C	12	0,032	10	0,023	1,53 (0,65-3,63)
T/G	82	0,221	95	0,216	1,10 (0,77-1,58)
T/C	115	0,309	127	0,288	1,16 (0,84-1,60)

* Grupo de referencia.

Niveles de VEGF-A en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis según los polimorfismos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A

El endometrio de las mujeres con endometriosis (n= 55) mostró mayores niveles de VEGF-A que el de las mujeres sin endometriosis (n= 52), tanto de mRNA ($9,83 \pm 0,89$ vs $6,43 \pm 0,51$, $P= 0,001$) como de proteína (313 ± 52 vs 104 ± 15 pg/mg, $P= 0,002$) (Figura 4.8a).

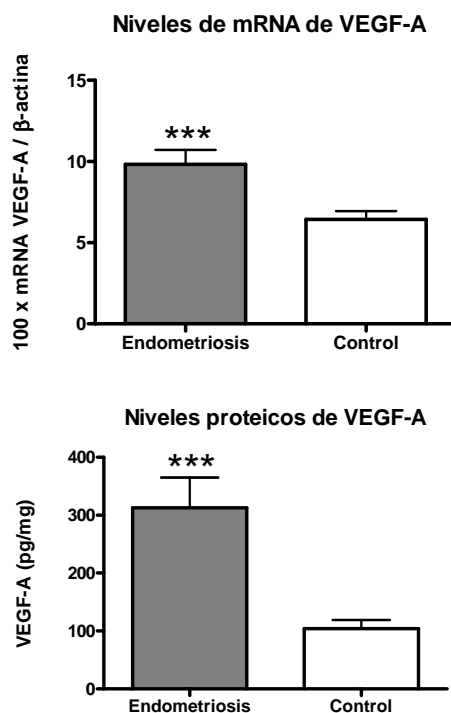


Figura 4.8a. Niveles proteicos y de mRNA de VEGF-A en tejido endometrial en mujeres con y sin endometriosis. Datos expresados como media \pm error estándar medio. *** $P < 0,005$.

Con el fin de evaluar si los polimorfismos del gen del VEGF-A modulaban los niveles de mRNA (Figura 4.8b) y proteína (Figura 4.8c) de VEGF-A, en tejido endometrial de mujeres con y sin endometriosis, agrupamos a las mujeres de acuerdo con sus genotipos. No se observó diferencias significativas en dichos niveles, al distinguir por

genotipo, entre los tres polimorfismos estudiados, ni en el endometrio de las mujeres con endometriosis ni en el de las mujeres sin endometriosis (Tabla 4.13).

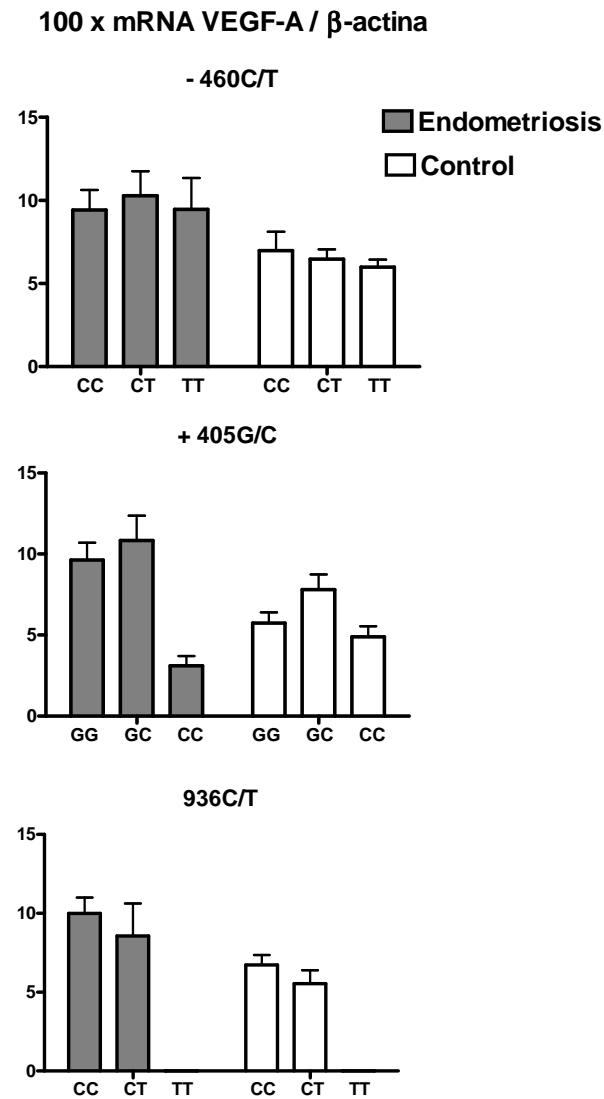


Figura 4.8b. Niveles de mRNA de VEGF-A en tejido endometrial de acuerdo con los genotipos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A. Datos expresados como media \pm error estándar medio.

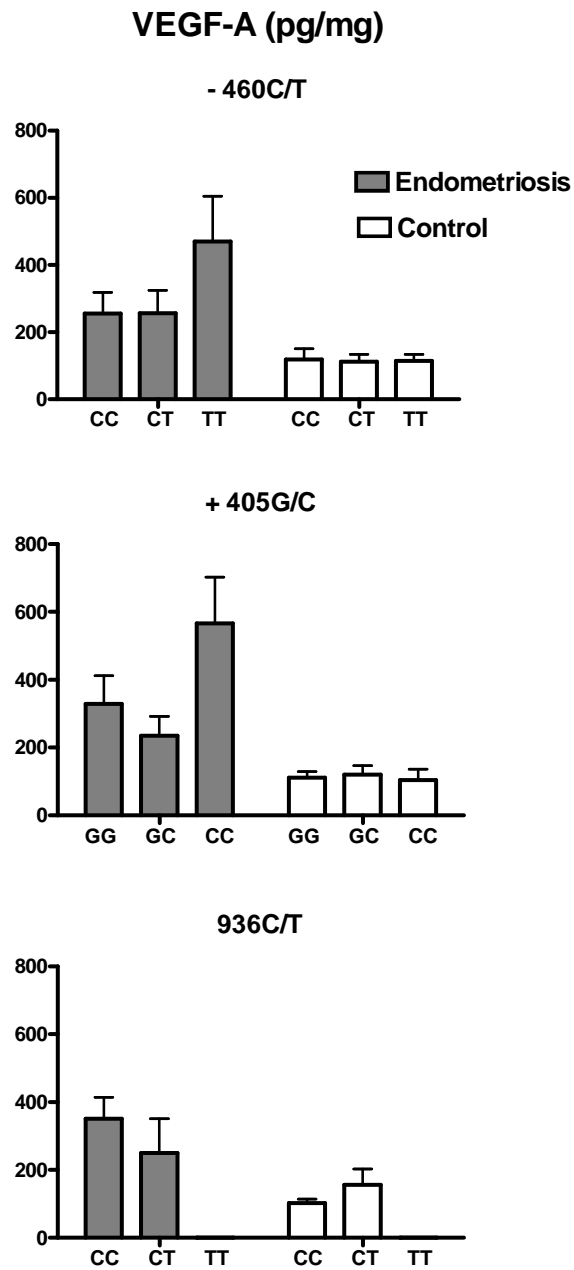


Figura 4.8c. Niveles proteicos de VEGF-A en tejido endometrial de acuerdo con los genotipos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A. Datos expresados como media \pm error estándar medio.

Tabla 4.13. Niveles de VEGF-A de acuerdo con los polimorfismos del gen del VEGF-A en endometrio de mujeres con y sin endometriosis.

ENDOMETRIO DE MUJERES CONTROL				
Genotipo -460C/T	-460CC (n=12)	-460CT (n=24)	-460TT (n=16)	ANOVA
VEGF-A mRNA	6,98±1,14	6,47±0,59	5,98±0,47	0,668
VEGF-A prot (pg/mg)	118±33	112±22	114±20	0,968
Genotipo +405G/C	+405GG (n=26)	+405GG (n=20)	+405GG (n=6)	ANOVA
VEGF-A mRNA	5,74±0,67	7,81±0,93	4,89±0,66	0,094
VEGF-A prot (pg/mg)	111±18	120±27	104±32	0,930
Genotipo 936C/T	936CC (n=39)	936CT (n=12)	936TT (n=1)	ANOVA*
VEGF-A mRNA	6,73±0,63	5,54±0,85	5,59	0,339
VEGF-A prot (pg/mg)	102±12	156±47	180	0,113
ENDOMETRIO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS				
Genotipo -460C/T	-460CC (n=15)	-460CT (n=25)	-460TT (n=15)	ANOVA
VEGF-A mRNA	9,42±1,21	10,28±1,48	9,47±1,88	0,901
VEGF-A prot (pg/mg)	255±63	256±68	470±135	0,184
Genotipo +405G/C	+405GG (n=27)	+405GG (n=25)	+405GG (n=3)	ANOVA
VEGF-A mRNA	9,63±1,07	10,84±1,53	3,11±0,60	0,159
VEGF-A prot (pg/mg)	329±83	235±57	566±137	0,287
Genotipo 936C/T	936CC (n=42)	936CT (n=12)	936TT (n=1)	ANOVA*
VEGF-A mRNA	9,99±1,00	8,55±2,07	18,3	0,510
VEGF-A prot (pg/mg)	351±63	250±101	130	0,438

Los datos se expresan como Media ± Error Estándar Medio. Los niveles de mRNA se representan normalizados frente a los niveles de β-actina (copias mRNA de estudio/100 copias mRNA β-actina). Los niveles de proteína están representados como la suma de los extractos citosólicos y de membrana (pg proteína/ mg proteína total). * En el ANOVA del polimorfismo 936C/T no se utiliza el grupo de individuos con genotipo 936TT.

Niveles de VEGF-A en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis según los polimorfismos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A

En el líquido peritoneal, el nivel proteico de VEGF-A fue significativamente mayor en mujeres con endometriosis (pacientes, n= 60) que sin endometriosis (controles, n= 30) ($8,44 \pm 1,70$ vs $4,50 \pm 0,89$ pg/mg, $P= 0,043$) (Figura 4.9a).

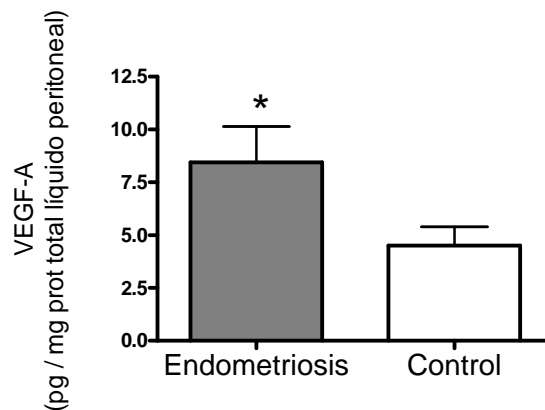


Figura 4.9a. Niveles proteicos VEGF-A en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis (control). Datos expresados como media ± SEM. *P < 0,05.

También se estudió si los polimorfismos del gen del VEGF-A modulan su nivel proteico en el líquido peritoneal. No se encontró asociación entre estos tres polimorfismos y los niveles proteicos de VEGF-A ni en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis ni en el de las mujeres sin endometriosis (Figura 4.9b y Tabla 4.14).

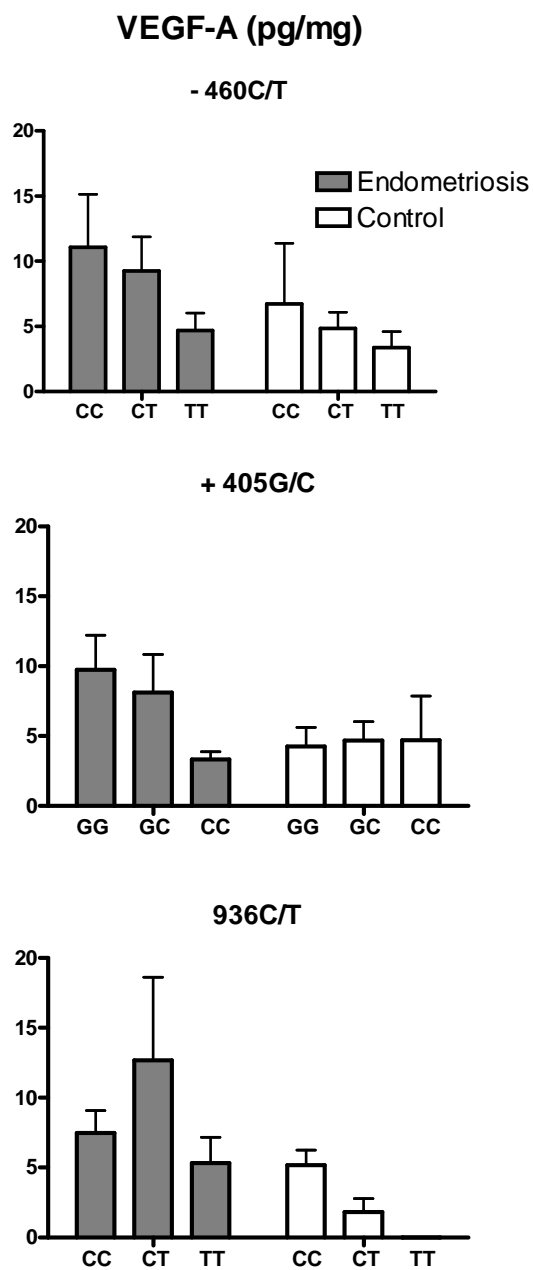


Figura 4.9b. Niveles proteicos VEGF-A en líquido peritoneal de acuerdo con los genotipos -460C/T, +405G/C y 936C/T del gen del VEGF-A. Datos expresados como media \pm error estándar medio.

Tabla 4.14. Niveles de VEGF-A de acuerdo con los polimorfismos del gen del VEGF-A en líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis.

LÍQUIDO PERITONEAL DE MUJERES CONTROL				
Genotipo -460C/T	-460CC (n=3)	-460CT (n=16)	-460TT (n=11)	ANOVA
VEGF-A prot (pg/mg)	6,73±4,65	4,86±1,23	3,37±1,23	0,536
Genotipo +405G/C	+405GG (n=13)	+405GG (n=15)	+405GG (n=2)	ANOVA
VEGF-A prot (pg/mg)	4,25±1,37	4,69±1,33	4,71±3,15	0,972
Genotipo 936C/T	936CC (n=24)	936CT (n=6)	936TT (n=0)	ANOVA*
VEGF-A prot (pg/mg)	5,17±1,09	1,82±0,95	-	0,133
LÍQUIDO PERITONEAL DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS				
Genotipo -460C/T	-460CC (n=11)	-460CT (n=34)	-460TT (n=15)	ANOVA
VEGF-A prot (pg/mg)	11,08±4,04	9,25±2,62	4,69±1,33	0,415
Genotipo +405G/C	+405GG (n=27)	+405GG (n=28)	+405GG (n=5)	ANOVA
VEGF-A prot (pg/mg)	9,74±2,49	8,11±2,73	3,33±0,54	0,603
Genotipo 936C/T	936CC (n=46)	936CT (n=12)	936TT (n=2)	ANOVA
VEGF-A prot (pg/mg)	7,48±1,59	12,67±5,95	5,33±1,84	0,456

Los datos se expresan como Media ± Error Estándar Medio. Los niveles de mRNA se representan normalizados frente a los niveles de β-actina (copias mRNA de estudio/100 copias mRNA β-actina). Los niveles de proteína están representados como la suma de los extractos citosólicos y de membrana (pg proteína/ mg proteína total). * En el ANOVA del polimorfismo 936C/T no se utiliza el grupo de individuos con genotipo 936TT.

4. 4. CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES

Uno de los objetivos del presente trabajo era evaluar si algún o algunos componentes presentes en el líquido peritoneal (LP) de las mujeres con endometriosis podían modular la expresión de diferentes componentes tanto del sistema fibrinolítico como de las metaloproteasas o de la angiogénesis, para lo que se estudió el efecto del líquido peritoneal de mujeres con endometriosis (LPE) y sin endometriosis (controles, LPC) sobre cultivos de células endometriales de mujeres con y sin endometriosis.

Para ello, se prepararon dos mezclas de LP, una de ellas formada por líquidos procedentes de 10 mujeres con endometriosis y la otra mezcla formada por otros 10 líquidos de mujeres sin endometriosis, todos recogidos en la fase secretora del ciclo menstrual.

4. 4. 1. EXPERIMENTOS PREVIOS PARA OPTIMIZAR LA CONCENTRACIÓN DE LÍQUIDO PERITONEAL UTILIZADO EN LOS CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES

Para analizar el volumen máximo de líquido peritoneal que se podía añadir a las células endometriales en cultivo sin afectar a su viabilidad, se incubaron estas células con distintas concentraciones de la mezcla de LP y se evaluó la viabilidad celular mediante el análisis de exclusión con el colorante “*trypan blue*”. Una concentración de LP de hasta el 25% del total de líquido de cultivo utilizado (concentración final en el medio) no tenía efecto sobre la viabilidad celular.

Como se indica en material y métodos, las células estromales fueron primero preacondicionadas en medio libre de suero bovino fetal (FBS) durante un periodo de 4 horas. A partir de entonces, se cambió el medio por uno suplementado con LP, a una concentración final de 0%, 10% y 25%, y se incubó durante otro periodo de 4 horas.

Cuando se trataron las células endometriales con medio libre de FBS y LP al 0%, 10% y 25%, el nivel proteico de VEGF-A y uPA en el sobrenadante de los cultivos

aumentaba conforme aumentaba la concentración de LP (Figura 4.10). De acuerdo con estos resultados preliminares, las células endometriales se trataron con medio suplementado con LP al 25% durante 4 horas en todos los experimentos posteriores.

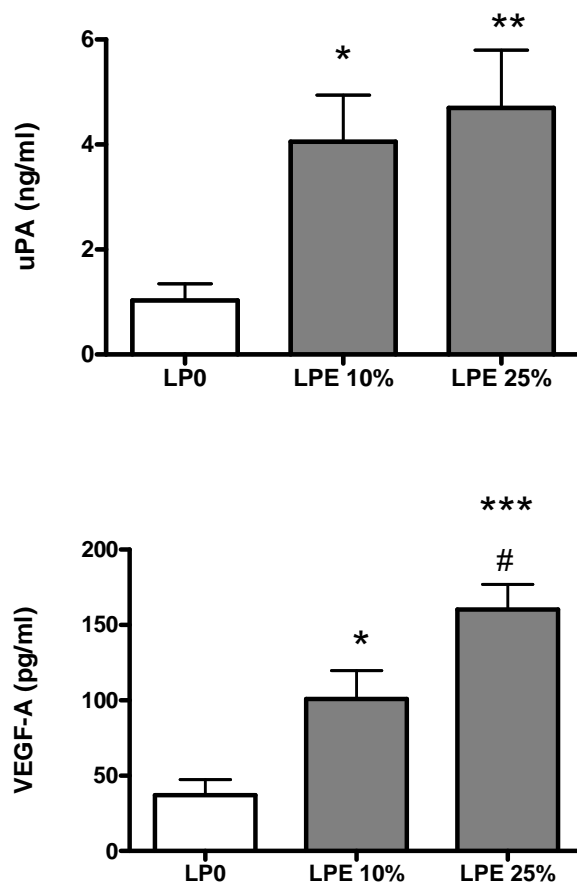


Figura 4.10. Niveles proteicos de uPA y VEGF-A, obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivos de células endometriales de mujeres con endometriosis, tratados con LPE. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Niveles de significación frente a cultivos sin líquido peritoneal (LPE 0): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Y niveles de significación frente a LPE 10%: # $P < 0,05$.

4. 4. 2. EFECTO DEL LÍQUIDO PERITONEAL SOBRE LOS NIVELES DE uPA, MMP-3 Y VEGF-A, EN CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES DE MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS

Las células endometriales se obtuvieron mediante cirugía laparoscópica en pacientes (n= 14) y en mujeres control (n= 6) tanto durante la fase proliferativa (n= 5 y n= 2, respectivamente) como durante la secretora (n= 9 y n= 4, respectivamente).

Los cultivos de células endometriales de mujeres con y sin endometriosis se trataron con medio libre de suero y LP procedente de mujeres con endometriosis (LPE) o sin endometriosis (LPC) a una concentración final del 25% (v:v) durante 4 horas, o bien con medio libre de suero y sin LP en las mismas condiciones (medio control, LP0).

El medio suplementado con una mezcla de LP, procedente tanto de mujeres con endometriosis (LPE) como de mujeres sin endometriosis (LPC), inducía en el cultivo endometrial de mujeres con y sin endometriosis un incremento significativo de uPA y VEGF-A, a nivel de mRNA y de proteína, comparado con el inducido por el medio control (LP0). (Figura 4.11a y b). Además, el mayor incremento en los niveles de uPA y VEGF-A se observó en los cultivos endometriales de mujeres con endometriosis tratados con medio suplementado con LP de mujeres con endometriosis (LPE).

En el caso de la MMP-3, el medio suplementado con LP, tanto de mujeres con y sin endometriosis (LPE y LPC), indujo un incremento de los niveles proteicos de MMP-3 en los sobrenadantes de los cultivos endometriales de mujeres con y sin endometriosis. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA obtenidos a partir de los extractos celulares de los cultivos. (Figura 4.11a y b).

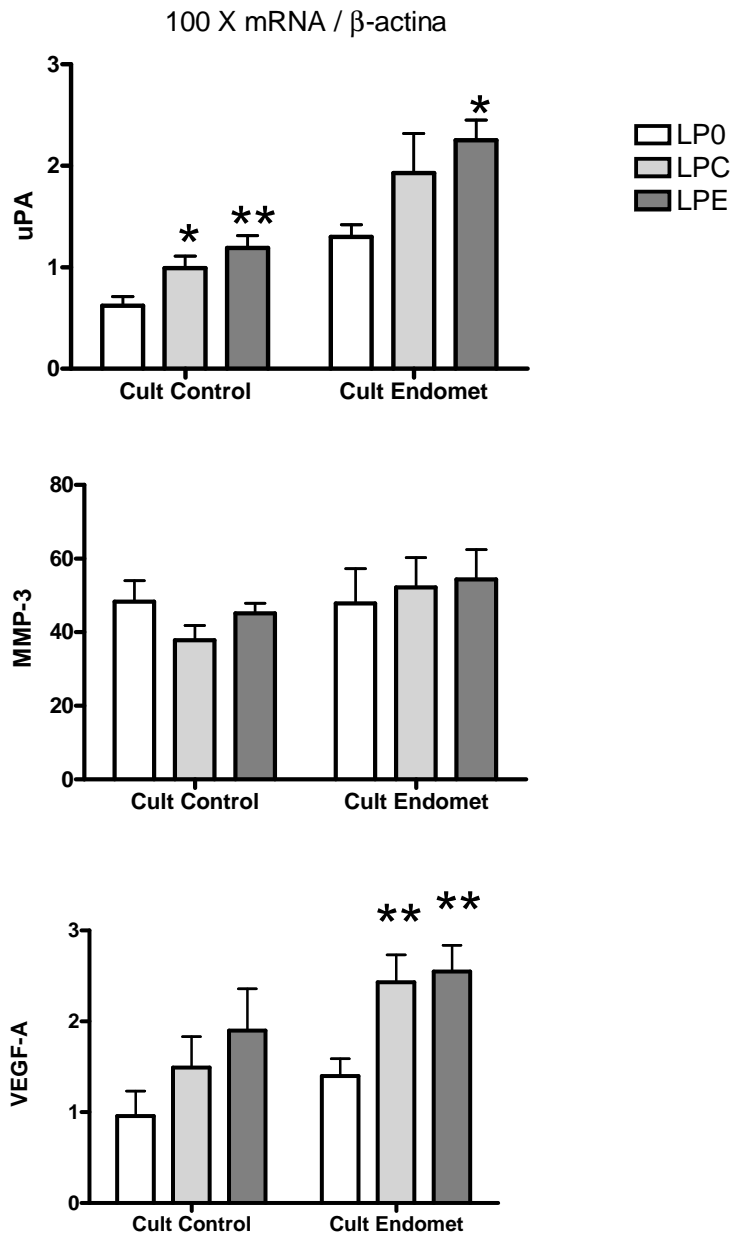


Figura 4.11a. Niveles de mRNA de los activadores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (uPA y MMP-3) y de la angiogénesis (VEGF-A), en cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Niveles de significación frente a cultivos sin líquido peritoneal (LP0): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

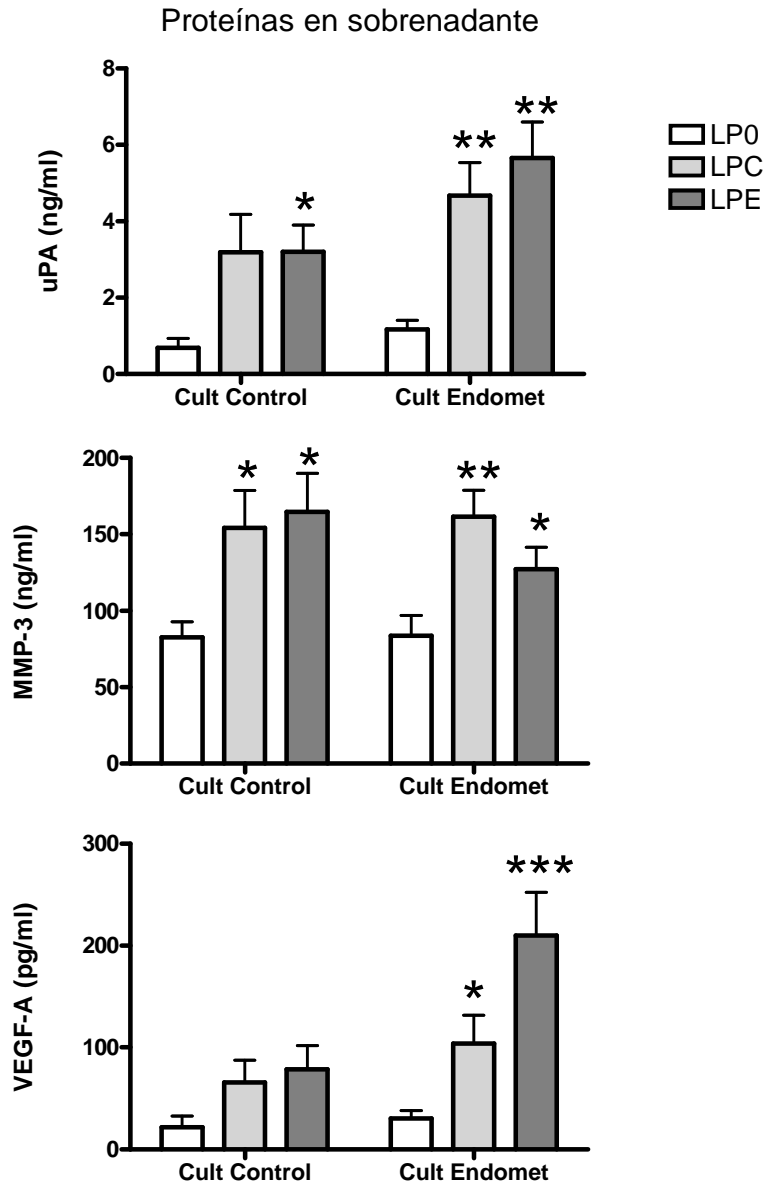


Figura 4.11b. Niveles proteicos de los activadores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (uPA y MMP-3) y de la angiogénesis (VEGF-A), en sobrenadantes de cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Niveles de significación frente a cultivos sin líquido peritoneal (LP0): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4. 4. 3. EFECTO DEL LÍQUIDO PERITONEAL SOBRE LOS NIVELES DE PAI-1, TIMP-1 Y TSP-1, EN CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOMETRIALES DE MUJERES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS

Mientras ambos tipos de medios suplementados con LP (LPE y LPC) indujeron un incremento en los niveles de PAI-1, a nivel de mRNA y proteína, en cultivos de mujeres control, no se observó un efecto significativo en los cultivos derivados de las mujeres con endometriosis. (Figura 4.12a y b).

Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de TIMP-1 al estudiar los distintos cultivos suplementados con distintos medios.

En relación al inhibidor angiogénico, TSP-1, al utilizar medio suplementado con LPE se observó un incremento en los niveles proteicos de TSP-1 en el sobrenadante del cultivo, aunque no así en los niveles de mRNA del extracto celular. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos al usar medio suplementado con LPC. (Figura 4.12a y b).

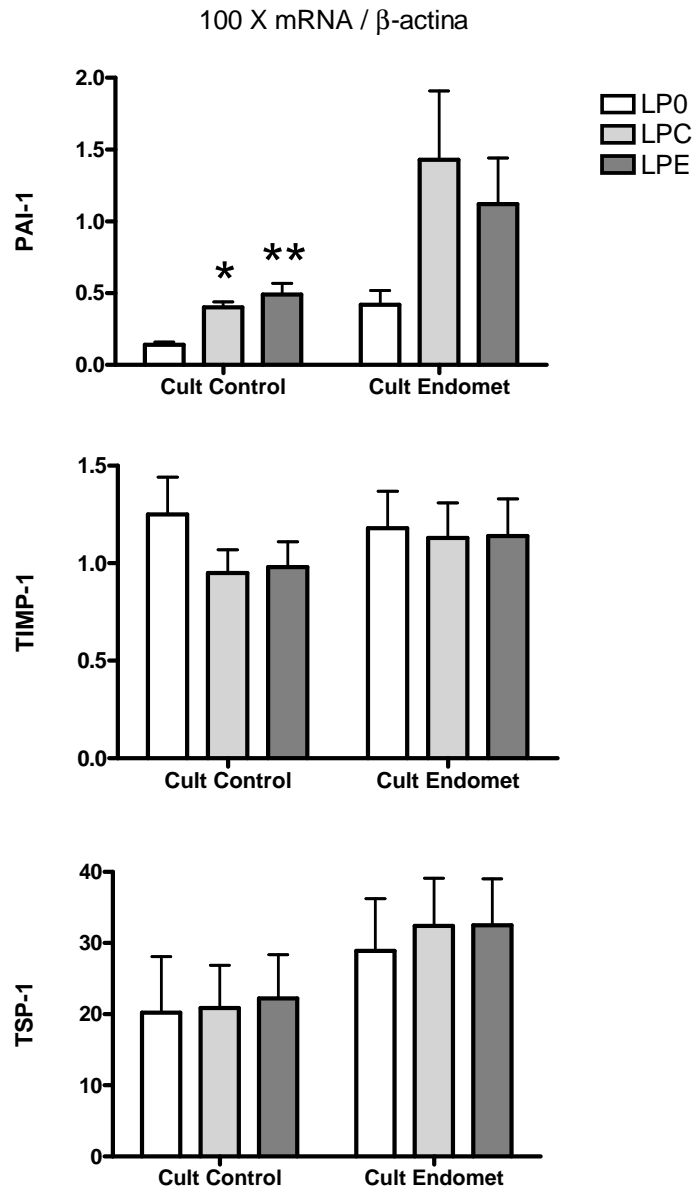
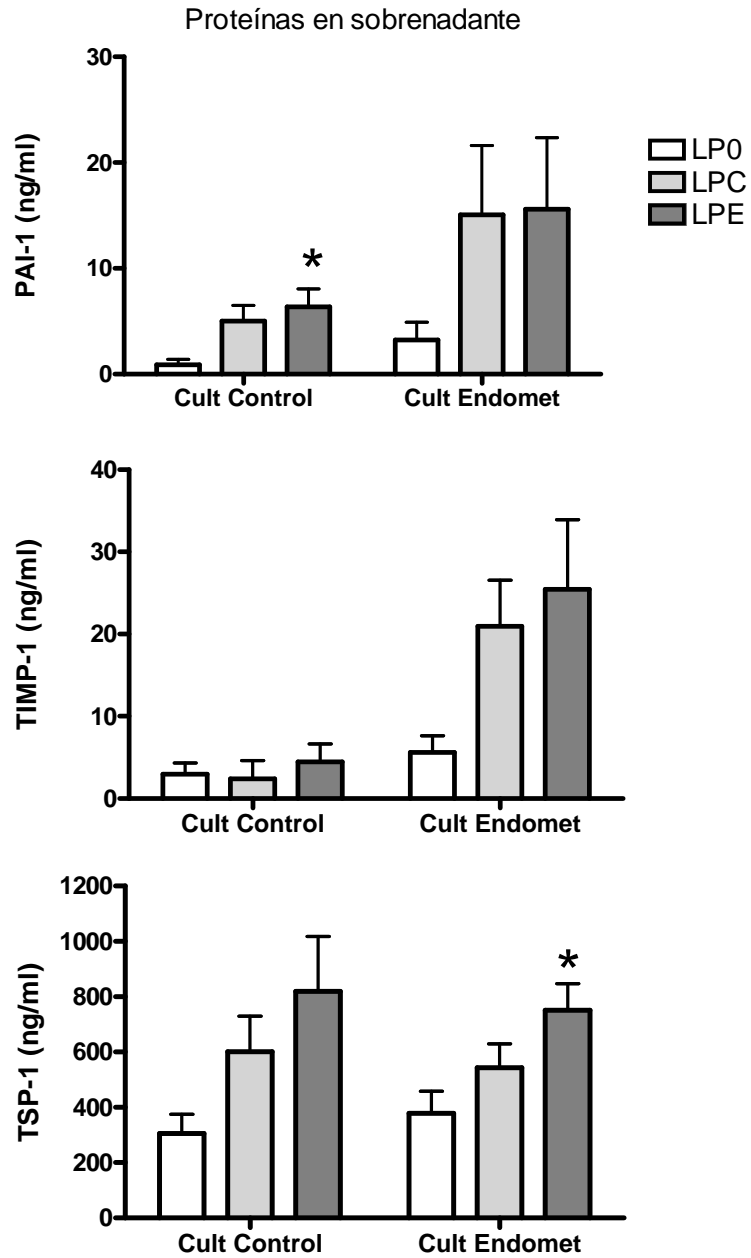


Figura 4.12a. Niveles de mRNA de los inhibidores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (PAI-1 y TIMP-1) y de la angiogénesis (TSP-1), en cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Niveles de significación frente a cultivos sin líquido peritoneal (LP0): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



*Figura 4.12b. Niveles proteicos de los activadores de los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas (PAI-1 y TIMP-1) y de la angiogénesis (TSP-1), en sobrenadantes de cultivos de células endometriales tratados con LPC y LPE. Datos expresados como media \pm error estándar medio. Niveles de significación frente a cultivos sin líquido peritoneal (LPO): * $P < 0,05$.*

4. 4. 4. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS TRAS EL TRATAMIENTO CON LÍQUIDO PERITONEAL

En los cultivos de células endometriales de mujeres sin endometriosis se observó una correlación positiva entre el porcentaje de cambio en los niveles de mRNA de VEGF-A con los de uPA y MMP-3 ($r = 0,657$, $P = 0,020$; $r = 0,778$, $P = 0,003$, respectivamente) y entre los niveles proteicos de VEGF-A con los de uPA y MMP-3 ($r = 0,745$, $P = 0,005$; $r = 0,602$, $P = 0,038$, respectivamente) (Figura 4.13). En los cultivos de células endometriales de mujeres con endometriosis también se observó una correlación positiva significativa entre el porcentaje de cambio en los niveles proteicos de VEGF-A y uPA ($r = 0,588$, $P < 0,05$) (datos no mostrados).

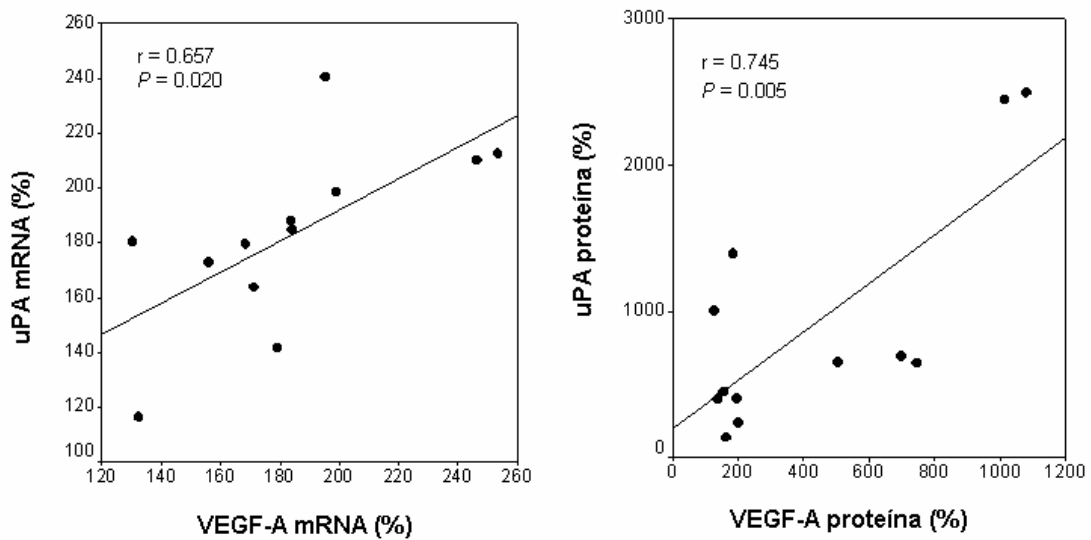


Figura 4.13. Correlación entre el porcentaje de cambio en los niveles de mRNA y proteína de VEGF-A frente a uPA, en cultivos endometriales de mujeres sin endometriosis tras el tratamiento con líquido peritoneal (25%), comparado con el cultivo sin líquido peritoneal.

5.- DISCUSIÓN

“Las opiniones son como los culos. Cada uno tiene el suyo.”

Clint Eastwood

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna pero de importante repercusión clínica y cuya etiología permanece todavía desconocida a pesar de varias décadas de estudio en este campo. La teoría de la implantación, basada en un proceso de menstruación retrógrada, supone la existencia de un tejido endometrial con capacidad de adhesión e invasión del tejido peritoneal y ovárico debido a su capacidad proteolítica sobre la matriz extracelular, procesos en los que están implicados los sistemas fibrinolítico y de las metaloproteasas [13, 638]. Además, este tejido, para poder crecer y sobrevivir, tiene unos requerimientos metabólicos que se verán satisfechos mediante la generación de nuevos vasos que lo irrigen.

Los sistemas fibrinolítico y de las MMPs en la endometriosis

Varios estudios sugieren que el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis tiene una expresión alterada de diversos componentes de los sistemas de activación del plasminógeno y de las MMPs, indicando que estos sistemas pueden jugar un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad [14, 41].

Se ha sugerido que una mayor concentración de uPA en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis podría producir fragmentos endometriales con mayor potencial para degradar la MEC tras su implantación en lugares ectópicos [13, 94, 592, 638].

En el presente trabajo observamos que el endometrio de las mujeres con endometriosis tiene niveles mayores, de mRNA y proteína, de uPA y MMP-3 frente a las mujeres sin endometriosis (Tabla 4.1), lo que puede favorecer la capacidad invasiva de este tejido. Previamente se ha observado que el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis mostraba un incremento en los niveles proteicos de la MMP-3 [464] y elevados niveles de mRNA de la MMP-9 [468]. Sin embargo en un modelo murino, el mRNA de la MMP-3 fue detectable en los implantes endometriósicos pero no en tejido uterino eutópico [467]. El problema de estos modelos *in vivo*, es que los roedores no desarrollan espontáneamente la endometriosis, lo que implica que no tendrán alteraciones

bioquímicas en su tejido endometrial, a diferencia de lo que ocurre en las mujeres con endometriosis. Esto explica la ausencia de alteraciones proteolíticas en el endometrio eutópico de las ratas. Las diferencias en los niveles de MMP-3 en el endometrio eutópico entre nuestro estudio y los modelos animales son importantes e implican a la MMP-3 del endometrio de las mujeres con endometriosis en la patogénesis de la enfermedad.

Los estudios *in vivo* indican que la progesterona es un potente inhibidor de la expresión a nivel de mRNA de la MMP-3 y también de su secreción proteica [460]. Las estromelisin, como la MMP-3, se expresan *in vivo* durante el remodelado asociado a la proliferación pero no durante la fase secretora del ciclo menstrual, dominada por progesterona [382].

Al distinguir por fase del ciclo, las diferencias de expresión de la uPA y la MMP-3 entre el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis y sin endometriosis sólo se mantuvieron durante la fase secretora, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Tabla 4.2). Estos hallazgos pueden indicar un fallo de la progesterona o factores producidos localmente para suprimir estas enzimas en mujeres con endometriosis y puede facilitar la implantación de los fragmentos endometriales tras el paso retrogrado a través de las trompas de Falopio.

En relación a las lesiones endometriósicas, estudios previos [593] han descrito un incremento en la expresión de mRNA de uPA en tejido endometriósico frente al endometrio eutópico. Sin embargo, en nuestro estudio no se observó ningún incremento de los niveles de mRNA de uPA en endometriomas ováricos. De hecho, los niveles de endometrio eutópico eran mayores que los niveles del endometrioma ovárico (Tabla 4.1). Las diferentes características de las muestras endometriósicas pueden ser la causa de esta discrepancia en los resultados. Como se ha sugerido previamente, la endometriosis parece ser una enfermedad progresiva, de forma que en estadios avanzados se produce una reducción en la actividad de las lesiones endometriósicas [639]. Nuestros resultados muestran que los niveles de mRNA de la uPA son mayores en los implantes endometriósicos que en los endometriomas ováricos. Además, los endometriomas ováricos mostraron unos niveles de mRNA de PAI-1 superiores al de los implantes

peritoneales (Tabla 4.5). De esta forma, el ratio uPA/PAI-1 fue superior en los implantes peritoneales que en los endometriomas ováricos. Estos resultados sugieren que los implantes peritoneales se corresponden con una lesión endometriósica activa, mientras que los quistes endometriósicos ováricos presentan una actividad proteolítica inferior.

También observamos un incremento en los niveles de PAI-1 y TIMP-1, tanto de mRNA como de proteína, en endometrioma ovárico comparado con los del endometrio eutéptico de las mujeres con y sin endometriosis (Tabla 4.1). El incremento en la expresión de PAI-1 y TIMP-1 en el endometrioma ovárico puede reducir el potencial invasivo del tejido endometriósico en estadios avanzados de la enfermedad.

En el caso del PAI-1, el incremento de los niveles proteicos fue mayor que el de los niveles de mRNA. Una posible explicación es que, en los endometriomas ováricos, los bajos niveles de proteasas como la MMP-3, la cual es capaz de hidrolizar específicamente al PAI-1 [599], pueden dar lugar a una menor degradación de la proteína PAI-1, dando lugar a un aumento en sus niveles proteicos. Este incremento en los niveles proteicos del PAI-1, en los endometriomas ováricos, puede contribuir a limitar el potencial invasivo del tejido endometriósico en estadios avanzados de la enfermedad, lo que explicaría la presencia de tejido ovárico sano en la periferia del quiste endometriósico que puede ser preservado durante la cirugía del mismo.

El incremento en los niveles de mRNA y proteína de TIMP-1 en tejido endometriósico ya se había descrito previamente [41, 477]. Sin embargo, otros autores han descrito una disminución de la expresión de TIMP-1 en tejido endometriósico al compararlo con el tejido endometrial [640]. Las lesiones endometriósicas sintetizan y secretan la proteína TIMP-1 *in vitro*, mientras que los niveles proteicos de TIMP-1 son inferiores en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis [477]. El incremento en la expresión de TIMP-1 observado en el endometrioma ovárico, en nuestro estudio, puede producir una inhibición adicional de la actividad proteolítica en esta localización.

Respecto al líquido peritoneal, en el presente estudio, se encontró niveles superiores de uPA, y MMP-3 en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis

(estadios III y IV) que en el de las mujeres control (Tabla 4.6). Este incremento de la actividad proteolítica en el líquido peritoneal podría alterar la reparación normal del peritoneo y su función como barrera, facilitando el proceso de implantación de fragmentos endometriales y el desarrollo de la lesión endometriósica.

En conclusión, la sobreexpresión de la uPA y la MMP-3 observada en el endometrio de las mujeres con endometriosis puede ser importante, al potenciar la capacidad invasiva y el crecimiento del tejido endometrial fuera del útero. Este proceso puede llevar a la formación de lesiones endometriósicas tempranas. Una vez se desarrolla el quiste endometriósico ovárico, se produce un incremento de la expresión del PAI-1 y el TIMP-1, de forma que la actividad proteolítica disminuye. Esta observación puede explicar el frecuente hallazgo clínico de un quiste endometriósico aislado sin invasión del tejido ovárico periférico.

Angiogénesis y endometriosis, su relación con los sistemas fibrinolítico y de las MMPs

Se ha descrito que el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis tiene una expresión alterada de diversos componentes de la angiogénesis, indicando su importancia en la endometriosis [584-587]. Sin embargo, no hay estudios previos a este trabajo que estudien la expresión simultánea de los niveles de mRNA y de proteína de VEGF-A, PIGF y TSP-1 y su correlación con algunos componentes de los sistemas fibrinolítico y de las MMPs en tejido y líquido peritoneal de mujeres con endometriosis.

Aunque algunos estudios previos indican que hay una mayor expresión de mRNA de VEGF-A en endometrio de mujeres con endometriosis que en controles [585, 587]. Print y col. [641] encontraron una producción de VEGF-A similar en cultivos de endometrio provenientes de mujeres con y sin endometriosis. En el presente estudio observamos un incremento en los niveles de VEGF-A, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en el endometrio de las mujeres con endometriosis, una condición que puede contribuir a la progresión de esta enfermedad. Aunque Print y col. [641] indican que la discrepancia de resultados puede deberse al criterio de selección de pacientes, este no

debe ser el caso, ya que los criterios de selección de nuestro grupo son similares. Es más, los cultivos de endometrio no pueden reproducir exactamente las condiciones *in vivo*, es decir, carecen de las modulaciones ambientales de las hormonas, factores de crecimiento o citoquinas, que están normalmente presentes en estudios *in vivo*, de forma que esta limitación puede influir en los resultados.

En relación a las lesiones endometriósicas, Takehara y col. [587] encontraron un incremento en la expresión de mRNA del VEGF-A en tejido endometriósico (en estadios tempranos) frente al endometrio eutópico de estas mujeres con endometriosis. Sin embargo, en nuestro estudio no detectamos ningún incremento en los niveles de mRNA de VEGF-A en endometriomas ováricos (estadios III-IV). Más bien al contrario, observamos una disminución en los niveles de mRNA y proteína de VEGF-A en tejido endometriósico III-IV frente al endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis (Tabla 4.3). Las características de las muestras endometriósicas pueden ser la razón de la discordancia entre estos resultados. Tal y como se ha indicado, la endometriosis parece ser una enfermedad progresiva y se ha observado una reducción de la actividad angiogénica de las lesiones endometriósicas en estadios avanzados de la enfermedad [639]. Los implantes endometriósicos peritoneales son lesiones con un elevado potencial invasivo de la MEC y angiogénico, mientras que los endometriomas ováricos son manifestaciones avanzadas de esta enfermedad con pequeña capacidad de remodelación del tejido circundante. De hecho, observamos una menor expresión proteica de VEGF-A en el endometrioma ovárico frente a la lesión endometriósica de tipo I-II (Tabla 4.5).

También se ha descrito que, además del VEGF-A, el endometrio humano expresa mRNAs que codifican para otros factores de crecimiento como el PlGF [588]. De cualquier forma, no se ha descrito previamente la expresión de PlGF en tejido endometriósico. Aunque se ha sugerido que el PlGF contribuye a la angiogénesis en condiciones patológicas [531], en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en los niveles de mRNA y proteicos del PlGF en extractos tisulares de pacientes y controles (Tabla 4.3).

En relación a los inhibidores angiogénicos, se ha sugerido que las alteraciones de la expresión de la TSP-1 pueden contribuir a distintas patologías vasculares del tracto reproductivo [590]. En el presente estudio se observó una disminución en los niveles de VEGF-A y un incremento en los de TSP-1 en endometrioma ovárico frente a endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis (Tabla 4.3). Los niveles de mRNA concuerdan con los descritos previamente por Tan y col. [585], aunque no hay estudios previos de los niveles proteicos de la TSP-1 en endometriosis.

El incremento de los niveles de TSP-1 puede ser responsable de la reducción de la actividad angiogénica en el endometrioma ovárico, lo que puede contribuir a la pequeña capacidad invasiva de este tejido. Se ha descrito que los niveles de TSP-1 en muestras endometriales son mayores en la fase secretora que en la proliferativa, y que la expresión de TSP-1 está regulada por progesterona [556]. En consonancia con estos datos, en nuestras muestras de endometrio de mujeres control, también se detectaron mayores niveles proteicos de TSP-1 en la fase secretora que en la proliferativa. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas en el endometrio de las mujeres con endometriosis. Todo ello sugiere que puede haber una respuesta alterada a la progesterona en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis, lo que podría estar en relación con una menor receptividad endometrial en esta fase del ciclo que tendría como consecuencia una menor capacidad fértil, observada con frecuencia en este grupo de pacientes.

Los pasos iniciales de la angiogénesis requieren proteólisis extracelular y entre las proteasas implicadas se encuentran las de los sistemas de activación del plasminógeno y de las MMPs [591, 599, 642]. Por lo tanto los elevados niveles de uPA y MMP-3, a nivel de mRNA y proteína, observados en el endometrio de las mujeres con endometriosis pueden contribuir a la angiogénesis y favorecer las propiedades invasivas del tejido. Es más, estudios con microarrays han descrito diferencias en el sistema de las MMPs entre los endometrios de mujeres con y sin endometriosis [643]. Además, en el presente trabajo, se ha observado una correlación significativa entre los niveles de uPA y VEGF-A (Figura 4.2).

Por otra parte, como se ha indicado en el apartado de resultados, al distinguir por fase del ciclo menstrual, sólo en la fase secretora del ciclo menstrual los niveles de mRNA y proteína de la uPA y la MMP-3 continuaban siendo significativamente superiores en endometrio de mujeres con endometriosis que en endometrio control, confirmando resultados previos [14, 95, 464, 644] (Tabla 4.2). Las diferencias en los niveles de VEGF-A continuaban siendo significativas entre estos dos tejidos (Tabla 4.4)

Estudios previos sugieren que tanto los factores endometriales como los peritoneales promueven la angiogénesis en la endometriosis [584, 645]. Respecto al líquido peritoneal, previamente se había descrito un incremento en los niveles del VEGF-A en las mujeres con endometriosis [65, 473, 583, 587, 646]. En nuestro estudio también hemos encontrado mayores niveles proteicos de VEGF-A en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (estadios III y IV) que en el de las mujeres control (Tabla 4.6). Aparte del incremento en los niveles de uPA y MMP-3, no se observaron diferencias significativas en el resto de los parámetros estudiados. Aunque también se ha descrito un incremento en los niveles de PIGF en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis en estadios iniciales [589], en nuestro estudio no se observaron estas diferencias, las cuales podrían deberse a los estadios avanzados de las pacientes en nuestro estudio. El incremento de VEGF-A puede estar relacionado con la endometriosis, de forma que permitiría al tejido ectópico sobrevivir en la cavidad peritoneal y desarrollar una lesión endometriósica.

Hull y col. [647] describieron que los agentes antiangiogénicos inhibían el crecimiento de los explantes en un modelo *in vivo* de endometriosis al interrumpir la formación de vasos, y que este efecto se podría aplicar a la enfermedad humana. Estos hallazgos sugieren que el uso de agentes antiangiogénicos puede ser una nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de la endometriosis [648, 649].

En conclusión, el incremento de VEGF-A sin un incremento significativo de la TSP-1 en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis puede indicar una mayor actividad angiogénica, la cual puede contribuir a incrementar la capacidad de implantación de las células endometriales en lugares ectópicos. El incremento de uPA,

MMP-3 y VEGF-A en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis puede permitir la invasión de tejido endometrial en localizaciones ectópicas y permitir, mediante la formación de nuevos vasos, el desarrollo y supervivencia de las lesiones endometriósicas. Un exceso de angiogénesis endometrial y peritoneal nos sugiere que los agentes antiangiogénicos se podrían usar como terapia para la endometriosis.

Polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y la endometriosis

El incremento de la actividad fibrinolítica en el endometrio de las mujeres con endometriosis puede contribuir al establecimiento de la lesión endometriósica [14, 95], pero otros factores genéticos y ambientales pueden modular la severidad de la enfermedad. Se ha descrito que los individuos con genotipo –675 4G4G del gen del PAI-1 poseen niveles plasmáticos de PAI-1 más elevados y una menor actividad fibrinolítica que los individuos con genotipo –675 5G5G, mientras que los heterocigotos poseen niveles intermedios [231-234]. Así pues, resultaba interesante estudiar si el polimorfismo –675 4G/5G del gen del PAI-1 se asocia con la predisposición de sufrir endometriosis.

La hipótesis de partida es que las mujeres portadoras del alelo 4G pueden producir mayores cantidades de PAI-1 (Figura 4.3c), dando lugar a una mayor inhibición de la fibrinólisis. La persistencia de la fibrina podría dar lugar a que en el peritoneo puedan quedar confinados fragmentos endometriales, lo que contribuiría al inicio de las lesiones endometriósicas.

En un trabajo previo, Bedaiwy y col. [650] observaron que la frecuencia del alelo 4G del gen del PAI-1 en 75 mujeres con endometriosis era significativamente superior a la observada en 43 mujeres control. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en este polimorfismo al comparar 170 mujeres con endometriosis frente a 219 mujeres control (Tabla 4.7) [651]. En un estudio posterior, realizado por Gentillini y col. [652] se observó una ligera asociación en el sentido opuesto que Bedaiwy y col. [650], de forma que las mujeres con genotipo 4G4G tenían un menor riesgo de desarrollar la enfermedad. Estos autores reconocen que, dada la limitada contribución del polimorfismo a la susceptibilidad de la enfermedad, se necesitaría

realizar un estudio con un mayor tamaño muestral. Además, concluyen que, en población caucásica, la posible asociación de una variación genética del sistema fibrinolítico con la predisposición de sufrir endometriosis no implica al polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, confirmando nuestros resultados [651].

La discrepancia de nuestros resultados con los obtenidos por Bedaiwy y col. puede deberse a algún sesgo en el grupo control (n= 43) del estudio anterior [650], posiblemente debido a que las poblaciones estudiadas son muy pequeñas para un estudio de asociación. De hecho, aunque la distribución del polimorfismo 4G/5G en los controles varía a lo largo de distintos estudios [653-656], la frecuencia del genotipo 5G5G siempre ha resultado ser inferior a 0,340 y la del genotipo 4G4G siempre ha resultado ser superior a 0,180. En contraste, la distribución descrita por Bedaiwy y col. [650] en el grupo control fue 0,560 para el genotipo 5G5G y de 0,120 para el 4G4G. Tampoco parece que las diferencias del fondo genético tengan importancia, ya que las mujeres en los tres estudios pertenecen al mismo grupo étnico.

En nuestro trabajo, también estudiamos si el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 modula los niveles endometriales de PAI-1 en mujeres con y sin endometriosis. En mujeres control, encontramos que los niveles de PAI-1 endometriales aumentan significativamente con el número de alelos 4G. Sin embargo, en las mujeres con endometriosis, aunque se observó esta misma tendencia, las diferencias no fueron significativas (Figura 4.3b). El significado de este hecho en la endometriosis aún debe aclararse.

Es más, los niveles de mRNA y proteicos del PAI-1 tendían a ser mayores en el endometrio de las pacientes que en el de las mujeres control, aunque sus diferencias no resultaron significativas ($P= 0,063$, $P= 0,073$) (Tabla 4.1). La ausencia de significación estadística para estas diferencias se puede deber a un tamaño muestral insuficiente en el estudio.

El líquido peritoneal parece jugar un papel importante en el proceso de implantación y el desarrollo de las lesiones endometriósicas de las pacientes con

endometriosis [645, 657]. En el presente trabajo, los niveles proteicos de PAI-1 en el líquido peritoneal estaban significativamente más elevados en pacientes que en controles. Es más, pacientes y controles con genotipo 4G4G tenían niveles superiores de PAI-1, aunque no significativos, que aquellos con genotipo 5G5G (Figura 4.4). El incremento en los niveles proteicos de PAI-1 en el líquido peritoneal de las pacientes puede deberse a la inflamación de bajo grado descrita previamente en la endometriosis [657]. Estos niveles elevados de PAI-1 en el líquido peritoneal pueden contribuir al empeoramiento de la fibrinólisis peritoneal, lo que facilita la formación de adhesiones debidas a la reducida eliminación de fibrina. Este hallazgo podría abrir líneas terapéuticas que permitieran el uso de sustancias profibrinolíticas a nivel peritoneal que utilizadas en el postoperatorio contribuyeran a la prevención de formación de nuevas adherencias.

En conclusión, las frecuencias genotípicas del polimorfismo 4G/5G no varían significativamente entre pacientes y controles. Los niveles de PAI-1 en el tejido endometrial de las mujeres control parecen estar asociados con el polimorfismo 4G/5G. El aumento de los niveles proteicos de PAI-1 observados en el líquido peritoneal de los pacientes puede contribuir a incrementar las lesiones peritoneales observadas en la endometriosis.

Polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 y la endometriosis

Como se ha comentado previamente, las células endometriales estromales expresan varias MMPs y la expresión alterada de esas proteasas puede llevar al establecimiento y progresión de la endometriosis. Además, polimorfismos genéticos localizados en la región promotora de los genes de las MMPs pueden producir un incremento en la expresión génica de estas MMPs, pudiendo conferir una mayor predisposición a sufrir endometriosis.

Distintos grupos han observado alteraciones en los niveles de MMP-3 en el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis frente al de las mujeres control [10, 14, 61, 95, 386] (Tabla 4.1) y por otro lado, el polimorfismo de inserción/delección

de una adenina (5A/6A) en la posición -1612 de la región promotora de la MMP-3 modifica la actividad transcripcional de forma específica de alelo, de forma que el alelo 5A está asociado con una mayor actividad transcripcional *in vitro*, aproximadamente el doble que el alelo 6A [387]. Por ello, nuestro grupo se decidió a estudiar la asociación de este polimorfismo con la predisposición de sufrir endometriosis.

Hay varias publicaciones en las que se estudia este polimorfismo con resultados contradictorios. Por un lado Shan y col. [394] observan un mayor riesgo para las mujeres portadoras de los alelos -1607 2G (de la MMP-1) / -1612 6A (de la MMP-3). Sin embargo, Ferrari y col. [398], en población italiana y Borghese y col. [399], en poblaciones con distinto origen étnico, siendo la población caucásica la más abundante, no encuentran ninguna relación entre estos dos polimorfismos (-1607 1G/2G de la MMP-1 y -1612 5A/6A de la MMP-3) con una predisposición genética a sufrir endometriosis.

En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 4.8). Sin embargo, no se puede tomar ninguna conclusión de nuestro estudio, ya que la población de individuos control no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. Pese a esto, las frecuencias alélicas de los controles obtenidas por nuestro grupo (5A= 0,399; 6A= 0,601) no son muy diferentes a las obtenidas en otro estudio en población española (5A= 0,476; 6A= 0,524) [658].

También analizamos si el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 era capaz de modular los niveles tisulares de MMP-3, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en el endometrio de mujeres con y sin endometriosis (Figura 4.5b), así como los niveles proteicos en el líquido peritoneal (Figura 4.6). En ninguno de los casos encontramos diferencias significativas, de forma que, al menos en tejido endometrial y en líquido peritoneal, el polimorfismo 5A/6A del gen de la MMP-3 no parece afectar a sus niveles de expresión. Sin embargo, observamos un incremento en la expresión de la MMP-3, a nivel de mRNA y proteico (Tabla 4.1), en el endometrio de las mujeres con endometriosis frente al de las mujeres control. Respecto al líquido peritoneal, también se observó que la expresión de MMP-3 era mayor en las mujeres con endometriosis que en las mujeres control (Tabla 4.6).

Polimorfismos del gen del VEGF-A y endometriosis

En el presente trabajo evaluamos tres polimorfismos funcionales del gen del VEGF-A (-460C/T, +405G/C y 936C/T) en mujeres con y sin endometriosis y, además, correlacionamos estos polimorfismos con la expresión de VEGF-A en tejido endometrial y líquido peritoneal [659].

No encontramos diferencias significativas, ni en las frecuencias genotípicas ni alélicas, entre las mujeres con y sin endometriosis para los polimorfismos -460C/T (Tabla 4.9) y +405G/C (Tabla 4.10) del gen del VEGF-A. Sin embargo, los pacientes con endometriosis mostraron una mayor frecuencia del alelo 936T que los controles (Tabla 4.11).

Este es el primer trabajo en el que se estudia la correlación entre estos tres polimorfismos y los niveles de VEGF-A en extractos endometriales y líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis.

Aunque en la mayoría de trabajos tampoco se encuentra asociación entre el polimorfismo -460C/T y la endometriosis [550-552, 660-663], Hsieh y col. [548] describieron que la presencia del alelo -460T confería una mayor susceptibilidad de sufrir endometriosis. Esta discrepancia puede deberse a que la distribución genotípica del polimorfismo -460C/T en la población de controles de dicho estudio [548] no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,00006$).

En relación al polimorfismo +405C/G, no observamos asociación entre este polimorfismo y la endometriosis, lo que concuerda con los resultados de otros grupos [552, 660, 661], pero está en desacuerdo con otros trabajos [549-551, 662, 663]. Sin embargo estos últimos trabajos también difieren en sus resultados, de forma que, según los grupos de Bhanoori y col. [550] y Altinkaya y col. [662] hay una mayor frecuencia del alelo +405G en mujeres con endometriosis, mientras que en los estudios de Kim y col. [551], Gentilini y col. [549] y Attar y col. [663] hay una mayor frecuencia del alelo +405C y/o del genotipo +405CC en las mujeres afectadas. Esta discrepancia a lo largo de los diferentes estudios puede deberse a las diferentes poblaciones estudiadas: Sur de la

India [550], Corea [551], Japón [552], Italia [549], Australia [660] China [661] y Turquía [662, 663]. Pero también hay que tener en cuenta los errores experimentales, así por ejemplo, en el estudio en población Turca de los polimorfismos -460C/T y +405G/C, realizado por Altinkaya y col. [662] en 98 mujeres con endometriosis y 94 controles, se observó una mayor frecuencia del alelo +405G y de los genotipos portadores de este alelo en mujeres con endometriosis que en las mujeres control. Sin embargo, la ausencia de individuos homocigotos para el corte de estos dos genotipos en controles (usaron endonucleasas de restricción para el genotipado), nos hace pensar que estos autores han sufrido un error de diseño experimental. Sus frecuencias genotípicas y alélicas (-460C 1,1% y +405G 5,3%, en controles) se alejan de las de cualquier estudio previo e incluso de estudios de su propia población [663].

En relación al polimorfismo 936C/T del VEGF-A, encontramos una asociación positiva entre el alelo 936T del gen del VEGF-A y la endometriosis. Este resultado está en consonancia con un trabajo realizado en población Japonesa [552] en el que hay mayor frecuencia del alelo 936T en mujeres con endometriosis en estadios III-IV que en mujeres control, aunque otros tres estudios no encuentran diferencias significativas en población Coreana [553], Australiana [660] y China [661]. No está claro si el polimorfismo 936C/T está asociado con la expresión del VEGF-A. Aunque Renner y col. [544] describieron que el genotipo 936CC está asociado con mayores niveles plasmáticos de VEGF-A que los genotipos 936CT y TT, Awata y col. [664] no encontró ninguna correlación significativa entre los polimorfismos del VEGF-A y los niveles séricos del VEGF-A.

La presencia del haplotipo -460C/+405G parece asociarse con una mayor actividad promotora y, por lo tanto, con una mayor expresión de VEGF-A, comparada con el haplotipo -460T/+405C [665]. Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a los resultados de los distintos grupos.

Aunque nuestro estudio [659] comprobó la existencia de desequilibrio de ligamiento, tanto en el grupo de mujeres sin endometriosis (control) como en el de mujeres con endometriosis, entre los polimorfismos -460C/T (rs833061) y +405G/C (rs2010963) (Figura 4.7), al analizar las frecuencias de los cuatro haplotipos resultantes

no se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles (Tabla 4.12). Ello concuerda con los resultados de Kim y col. [551], que pese a encontrar una mayor frecuencia del genotipo +405CC, no encuentran diferencias en las frecuencias haplotípicas. Además, Ikuhashi y col. [552] en población japonesa, y Zhao y col. [660] en población australiana, tampoco encuentran diferencias en las frecuencias alélicas ni genotípicas de los polimorfismos -460C/T o +405G/C, ni en las frecuencias haplotípicas derivadas de su combinación, entre mujeres con y sin endometriosis.

Sin embargo, otros autores sí que encuentran asociación entre determinados haplotipos y la endometriosis. Así por ejemplo Bhanoori y col. [550], describen una mayor frecuencia del genotipo +405GG y del alelo +405G en mujeres con endometriosis que en controles ($P= 0,002$), así como una menor frecuencia del haplotipo -460T/+405C en mujeres con endometriosis que en controles ($P= 0,016$). Pero Attar y col. [663] obtienen resultados totalmente opuestos, de forma que encuentran una mayor frecuencia del genotipo +405CC ($P= 0,027$) y del haplotipo -460T/+405C ($P= 0,011$) en mujeres con endometriosis que en controles ($P= 0,027$).

Se ha descrito que tan solo el 16% de los estudios de asociación genética se replican con éxito [666]. En el caso de la endometriosis, se ha investigado la asociación de distintos genes candidato con la endometriosis, estando la mayoría de ellos implicados en los procesos de detoxificación, biosíntesis de esteroides y sus receptores y regulación del sistema inmunológico. Y, al igual que ocurre en otras enfermedades complejas, la mayoría de los hallazgos positivos no se han podido replicar [652].

La mayoría de estos estudios no concuerdan debido a la posible implicación de numerosos genes con efectos modestos, al sesgo producido por el uso de pequeñas poblaciones y además por el sesgo en las publicaciones, ya que los investigadores, editores y revisores tienden a enviar o a aceptar manuscritos para su publicación basados en resultados positivos, siendo los negativos difíciles de localizar [652].

No hay trabajos previos al nuestro [659] que estudien la influencia de estos tres polimorfismos del gen del VEGF-A sobre su expresión en tejido endometrial y líquido

peritoneal en mujeres con y sin endometriosis. Como hemos indicado previamente [10], junto con otros grupos [65, 473, 583, 585, 587], observamos un incremento en los niveles de VEGF-A en el endometrio (Tabla 4.3 y Figura 4.8a) y en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (Tabla 4.6 y Figura 4.9a), lo que sugiere que hay un incremento de la actividad angiogénica. Este aumento de la angiogénesis puede contribuir a la capacidad de implantación de las células endometriales en lugares ectópicos, permitiendo el desarrollo de una lesión endometriósica.

Sin embargo, no hemos observado diferencias significativas en los niveles de VEGF-A en tejido endometrial (Figura 4.8b, c y Tabla 4.13) y líquido peritoneal (Figura 4.9b y Tabla 4.14) en los tres polimorfismos estudiados, tanto en pacientes como en controles [659]. Se ha demostrado que los macrófagos activados del líquido peritoneal son una fuente de VEGF-A en endometriosis y que, además, la expresión del VEGF-A está regulada por esteroides ováricos [65]. Se ha descrito que, en la endometriosis, aumenta el número y la activación de los macrófagos, lo que podría explicar los elevados niveles de VEGF-A en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis [65]. Aunque en el presente estudio el VEGF-A parece estar relacionado con la endometriosis, los niveles de VEGF-A no parecen estar modulados por ninguno de los tres polimorfismos estudiados, ni en pacientes ni en mujeres control. Nuestros resultados [659] indican que estos polimorfismos no son buenos marcadores de endometriosis y que el polimorfismo 936C/T del VEGF-A puede estar asociado con el riesgo de endometriosis en población caucásica, aunque el incremento en los niveles de VEGF-A observados en la endometriosis no parece estar asociado con este polimorfismo.

Influencia del líquido peritoneal en la expresión de factores angiogénicos y proteolíticos en cultivos de células endometriales

Varios estudios, incluyendo los resultados del presente trabajo [11], sugieren que el endometrio eutópico y el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis alteran la expresión de algunos componentes de los sistemas de activación del plasminógeno y de

las MMPs y, también, de la angiogénesis, indicando que estos sistemas pueden jugar un papel importante en la patogenia de esta enfermedad [8, 10, 14, 41, 95, 584-587, 667]. Sin embargo, no hay estudios previos del efecto del líquido peritoneal, de mujeres con y sin endometriosis, en la expresión y liberación de distintos componentes proteolíticos y angiogénicos en cultivos de células endometriales de mujeres con la enfermedad y controles.

La proteólisis extracelular está implicada en los estadios iniciales de la angiogénesis, y entre el grupo de proteasas implicadas se incluyen componentes del sistema de activación del plasminógeno y de las MMPs [223, 591, 599, 642]. Dado que el VEGF-A induce la expresión de uPA [591], parece razonable estudiar simultáneamente la expresión de los sistemas fibrinolítico, de las MMPs y de la angiogénesis.

En relación a los parámetros de los sistemas de proteasas estudiados en este trabajo, se observa que el líquido peritoneal, tanto de mujeres control como con endometriosis, induce significativamente los niveles de mRNA y proteína de uPA y los niveles proteicos de la MMP-3 en los cultivos de células endometriales (Figura 4.11a y b). Mientras, ambos tipos de medios suplementados con el líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis indujeron un incremento en los niveles de PAI-1, a nivel de mRNA y proteína, en cultivos de mujeres control, sin embargo no se observó un efecto significativo en los cultivos derivados de las mujeres con endometriosis (Figura 4.12a y b). Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de TIMP-1 al estudiar los distintos cultivos suplementados con distintos medios (Figura 4.12a y b) [11].

Por otra parte, se observó que el líquido peritoneal, tanto de mujeres control como con endometriosis, inducía un incremento significativo en los niveles de mRNA y proteína de VEGF-A en los cultivos procedentes de las mujeres con endometriosis (Figura 4.11a y b), mientras que la TSP-1 solo se incrementaba significativamente en los cultivos de células endometriales procedentes de mujeres con endometriosis y tratadas con líquido peritoneal de mujeres con endometriosis (Figura 4.12a y b). El elevado incremento del VEGF-A observado en el endometrio de las mujeres con endometriosis

puede indicar una mayor actividad angiogénica, la cual puede contribuir a la capacidad de implantación de las células endometriales en sitios ectópicos [11].

El presente estudio [11] muestra que el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis es el que induce un mayor incremento de expresión de mRNA de uPA y VEGF-A (en extracto celular) y un mayor incremento de liberación proteica de uPA y VEGF-A (en sobrenadante del cultivo), en cultivos endometriales de mujeres con la enfermedad (Figura 4.11a y b). El líquido peritoneal contiene distintas citoquinas, factores de crecimiento, hormonas esteroideas y factores proteolíticos y angiogénicos [645]. Es más, en el líquido peritoneal se han detectado distintos tipos celulares como macrófagos, eritrocitos y células endometriales [645]. Los macrófagos activados secretan IL-1 β , que incrementa la expresión de mRNA del VEGF-A en cultivos de células estromales humanas de mujeres con endometriosis [668]. Además, el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis induce la producción y liberación de VEGF-A por neutrófilos [646]. De esta forma, algunas citoquinas o factores de crecimiento presentes en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis pueden contribuir a incrementar la angiogénesis en células las endometriales de mujeres con endometriosis.

También se observó una correlación positiva significativa entre el porcentaje de cambio en los niveles de uPA y MMP-3 y los niveles de VEGF-A (Figura 4.13). El incremento en los factores proteolíticos inducidos por el líquido peritoneal de pacientes también puede favorecer la angiogénesis y las propiedades invasivas de este tejido. El desarrollo de explantes endometriósicos implica los siguientes eventos celulares: adhesión, invasión, proliferación y neovascularización. Algunos de estos eventos usan procesos similares, por ejemplo, tanto durante la invasión como la neovascularización se utilizan procesos proteolíticos [669].

Los niveles de mRNA y proteicos de de los componentes proteolíticos y angiogénicos pueden reflejar la regulación transcripcional y postranscripcional de estos componentes y la relación de estos eventos críticos en el desarrollo de la endometriosis. En el presente trabajo [11] se observó que el líquido peritoneal induce un mayor incremento en los niveles proteicos de uPA, MMP-3 y VEGF-A que en los niveles de

mRNA correspondientes. Estos resultados sugieren que ciertas proteínas del líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis regulan, a nivel transcripcional y postranscripcional, factores proteolíticos y angiogénicos en cultivos endometriales de mujeres con endometriosis.

Es más, los aumentos de las actividades proteolítica y angiogénica en el endometrio pueden no ser las únicas alteraciones responsables para el proceso de implantación en lugares ectópicos. Un ambiente peritoneal alterado, con capacidad incrementada para inducir y potenciar alteraciones en el tejido endometrial, puede ser una condición necesaria para la patogénesis de la enfermedad.

En conclusión, el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis induce mayores niveles de uPA y VEGF-A en cultivos de células endometriales de mujeres con endometriosis que el líquido peritoneal de las mujeres control. Los niveles más altos se observaron en cultivos de células endometriales de las pacientes de endometriosis.

Así, las interacciones endometriales-peritoneales inducen un incremento en los factores proteolíticos y angiogénicos en las células endometriales, participando de esta forma en el establecimiento y mantenimiento de la endometriosis peritoneal. De cualquier forma, el mecanismo específico por el cual se producen factores proteolíticos y angiogénicos en las células endometriales tratadas con líquido peritoneal necesita ser investigado en profundidad.

En la actualidad nuestro grupo de trabajo está analizando el papel de diversos microRNAs relacionados con la angiogénesis y proteólisis en la endometriosis, con la finalidad de saber si una expresión alterada de los miRNAs que modulan estos procesos podría ser la causa del desequilibrio de los mismos en la endometriosis [670]. De esta manera, nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a modular los miRNAs alterados (mediante el bloqueo de los sobreexpresados o la potenciación de los subexpresados) [671], podrían suponer un verdadero avance en el conocimiento y en el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas encaminadas al tratamiento de la enfermedad establecida o a la prevención de recurrencias tras el tratamiento quirúrgico de la misma.

6.- CONCLUSIONES

“Normalmente no rezo, pero si estás ahí, por favor, sálvame Superman”

Homer Simpson

1. El endometrio de las mujeres con endometriosis posee una mayor capacidad proteolítica y angiogénica mediada por un aumento de los niveles de mRNA y proteína de uPA, MMP-3 y VEGF-A. Todo ello explicaría la capacidad de las células endometriales de degradar la matriz extracelular e implantarse en localizaciones ectópicas y desencadenar la formación de la lesión endometriósica inicial.
2. La mayor expresión de los inhibidores, PAI-1, TIMP-1 y TPS-1 en el endometrioma ovárico sugiere que se trata de una lesión con una baja actividad proteolítica y angiogénica.
3. El aumento de uPA, MMP-3 y VEGF-A en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis podría permitir el desarrollo de la lesión endometriósica. El aumento de los niveles de PAI-1 en líquido peritoneal de las pacientes podría contribuir al aumento de las adherencias peritoneales observado en estas pacientes.
4. La distribución del genotipo 4G/5G del gen del PAI-1 es similar en pacientes y controles. Sin embargo, en mujeres control los niveles de PAI-1 en tejido endometrial y líquido peritoneal se asociaron con dicho polimorfismo, siendo más elevados en las mujeres con genotipo 4G/4G.
5. En relación a los polimorfismos estudiados del gen del VEGF-A, nuestros resultados sugieren que el polimorfismo 936C/T puede estar asociado con el riesgo de endometriosis. Sin embargo, el aumento de los niveles de VEGF-A que se observa en el endometrio eutópico y en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis no parece asociarse con este polimorfismo.

6. El líquido peritoneal de mujeres con endometriosis induce mayores niveles de uPA y VEGF-A en cultivo de células endometriales de mujeres con endometriosis que el líquido peritoneal control. Ello indica que la interacción endometrio-líquido peritoneal induce un aumento de factores angiogénicos y fibrinolíticos que puede contribuir al desarrollo de las lesiones endometriósicas.

7. Los resultados del presente estudio sugieren que el aumento de activadores proteolíticos y de factores angiogénicos en el endometrio de mujeres con endometriosis podría contribuir al potencial invasivo de las células endometriales. El aumento de inhibidores y la disminución de la actividad proteolítica y angiogénica observados en el tejido endometriósico podría explicar el frecuente hallazgo clínico del quiste ovárico endometriósico aislado sin invasión del tejido ovárico circundante.

8. La existencia de un desequilibrio proteolítico y angiogénico a nivel endometrial, peritoneal y en el tejido endometriósico podría abrir nuevas líneas de investigación encaminadas a una mayor comprensión de los mecanismos implicados y a la aplicación de nuevas terapias.

7.- BIBLIOGRAFIA

¿El saber no ocupa lugar?

1. Giudice L, Tazuke S, Swiersz L: **Status of current research on endometriosis.** *J Reprod Med* 1998, **43**:252-262.
2. Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, Garcia-Velasco J, Remohí J, Simón C: **Endometrial quality in infertile women with endometriosis.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **943**:122-130.
3. Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Ordi J, Martínez-Román S, Vanrell J: **Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study.** *Hum Reprod* 1996, **11**:387-391.
4. Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive D, Jones E: **The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program.** *Fertil Steril* 1996, **65**:603-607.
5. Navarro J, Garrido N, Remohí J, Pellicer A: **How does endometriosis affect infertility?** *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003, **30**:181-192.
6. Sampson J: **Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity.** *Am J Obstet Gynecol* 1927, **14**:422-469.
7. Ulukus M, Arici A: **Immunology of endometriosis.** *Minerva Ginecol* 2005, **57**:237-248.
8. Gilabert-Estelles J, Castello R, Gilabert J, Ramon L, Espana F, Romeu A, Estelles A: **Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis.** *Front Biosci* 2005, **10**:1162-1176.
9. Gilabert-Estelles J, Ramon L, España F, Gilabert J, Castello R, Estelles A: **Expression of the fibrinolytic components in endometriosis.** *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006, **35**:136-140.
10. Gilabert-Estellés J, Ramón L, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, Castelló R, Chirivella M, Estellés A: **Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems.** *Hum Reprod* 2007, **22**:2120-2127.
11. Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón L, Gómez-Lechón M, Gilabert J, Chirivella M, Braza-Boils A, España F, Estellés A: **Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis.** *Hum Reprod* 2010, **25**:398-405.
12. Stefansson H, Geirsson R, Steinthorsdottir V, Jonsson H, Manolescu A, Kong A, Ingadottir G, Gulcher J, Stefansson K: **Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis.** *Hum Reprod* 2002, **17**:555-559.
13. Kobayashi H: **Invasive capacity of heterotopic endometrium.** *Gynecol Obstet Invest* 2000, **50 Suppl 1**:26-32.
14. Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J: **Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis.** *Hum Reprod* 2003, **18**:1516-1522.
15. Eyster K, Boles A, Brannian J, Hansen K: **DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis.** *Fertil Steril* 2002, **77**:38-42.
16. Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nakamura Y: **Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis.** *Int J Oncol* 2003, **22**:551-560.

17. Wren J, Wu Y, Guo S: **A system-wide analysis of differentially expressed genes in ectopic and eutopic endometrium.** *Hum Reprod* 2007, **22**:2093-2102.
18. Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, Chegini N: **The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression.** *Mol Hum Reprod* 2007, **13**:797-806.
19. Knapp V: **How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease.** *Fertil Steril* 1999, **72**:10-14.
20. Von Rokitsansky C: **Ueber Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus- und Ovarial-Sarcomen.** *Ztsch KK Gesellsch der Aerzte zu Wien* 1860, **37**:577-581.
21. Russell W: **Russell WW. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of müllerian origin.** *Bull Johns Hopkins Hosp* 1899; **10**:8-10. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1899, **10**:8-10.
22. Sampson J: **Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. Their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type ("adenomyoma" of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid, etc.).** *Arch Surg* 1921, **3**:245-323.
23. Sampson J: **The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis.** *Am J Obstet Gynecol* 1940, **40**:549-557.
24. Halban J: **Metastatic hysteroadenosis.** *Wien Klin Wochenschr* 1924, **37**:1205-1206.
25. Merrill J: **Spontaneous endometriosis in the Kenya baboon (Papio doguera).** *Am J Obstet Gynecol* 1968, **101**:569-570.
26. Dick EJ, Hubbard G, Martin L, Leland M: **Record review of baboons with histologically confirmed endometriosis in a large established colony.** *J Med Primatol* 2003, **32**:39-47.
27. Halme J, Hammond M, Hulka J, Raj S, Talbert L: **Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis.** *Obstet Gynecol* 1984, **64**:151-154.
28. Liu D, Hitchcock A: **Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology.** *Br J Obstet Gynaecol* 1986, **93**:859-862.
29. Keettel W, Stein R: **The viability of the cast-off menstrual endometrium.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1951, **61**:440-442.
30. Koks C, Dunselman G, de Goeij A, Arends J, Evers J: **Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies.** *Fertil Steril* 1997, **68**:560-564.
31. Kruitwagen R, Poels L, Willemsen W, de Ronde I, Jap P, Rolland R: **Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase.** *Fertil Steril* 1991, **55**:297-303.
32. Ridley J, Edwards I: **Experimental endometriosis in the human.** *Am J Obstet Gynecol* 1958, **76**:783-789; discussion 789-790.
33. D'Hooghe T, Bambra C, Raeymaekers B, De Jonge I, Lauweryns J, Koninckx P: **Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (Papio cynocephalus and Papio anubis).** *Am J Obstet Gynecol* 1995, **173**:125-134.
34. Witz C, Montoya-Rodriguez I, Schenken R: **Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion.** *Fertil Steril* 1999, **71**:56-60.
35. Witz C, Thomas M, Montoya-Rodriguez I, Nair A, Centonze V, Schenken R: **Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium.** *Fertil Steril* 2001, **75**:385-390.
36. Sanfilippo J, Wakim N, Schikler K, Yussman M: **Endometriosis in association with uterine anomaly.** *Am J Obstet Gynecol* 1986, **154**:39-43.

37. Olive D, Henderson D: **Endometriosis and mullerian anomalies.** *Obstet Gynecol* 1987, **69**:412-415.
38. TeLinde R, Scott R: **Experimental endometriosis.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1950, **60**:1147-1173.
39. Jenkins S, Olive D, Haney A: **Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution.** *Obstet Gynecol* 1986, **67**:335-338.
40. Hoshiai H, Ishikawa M, Sawatari Y, Noda K, Fukaya T: **Laparoscopic evaluation of the onset and progression of endometriosis.** *Am J Obstet Gynecol* 1993, **169**:714-719.
41. Sharpe-Timms K: **Endometrial anomalies in women with endometriosis.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **943**:131-147.
42. Oral E, Arici A: **Pathogenesis of endometriosis.** *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997, **24**:219-233.
43. Lebovic D, Mueller M, Taylor R: **Immunobiology of endometriosis.** *Fertil Steril* 2001, **75**:1-10.
44. Koninckx P, Kennedy S, Barlow D: **Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid.** *Gynecol Obstet Invest* 1999, **47 Suppl 1**:23-33.
45. Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K: **Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis.** *Hum Reprod Update* 1998, **4**:719-723.
46. Harada T, Enatsu A, Mitsunari M, Nagano Y, Ito M, Tsudo T, Taniguchi F, Iwabe T, Tanikawa M, Terakawa N: **Role of cytokines in progression of endometriosis.** *Gynecol Obstet Invest* 1999, **47 Suppl 1**:34-39; discussion 39-40.
47. Harada T, Iwabe T, Terakawa N: **Role of cytokines in endometriosis.** *Fertil Steril* 2001, **76**:1-10.
48. Cullen T: **Adenomyoma of the round ligament.** *Bull John Hopkins Hosp* 1896, **7**:112.
49. Meyer R: **Über eine adenomatöse Wucherung der Serosa in einer Bauchnarbe.** *Geburtsh Gynakol* 1903, **49**:32-41.
50. Von Recklinghausen F: **Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the wolffian body.** *Wien Klin Wochenschr* 1896, **8**:530.
51. Jubanyik K, Comite F: **Extrapelvic endometriosis.** *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997, **24**:411-440.
52. Javert C: **Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes.** *Cancer* 1949, **2**:399-410.
53. Nisolle M, Donnez J: **Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities.** *Fertil Steril* 1997, **68**:585-596.
54. Belaisch J, Audebert A, Brosens I, Canis M, Leroy J, Tran D: **Physiopatologie de l'endometriose.** In *L'endometriose*. Edited by Masson. Paris; 1999: 13-24
55. Vercellini P, De Giorgi O, Aimi G, Panazza S, Uglietti A, Crosignani P: **Menstrual characteristics in women with and without endometriosis.** *Obstet Gynecol* 1997, **90**:264-268.
56. Tabibzadeh S: **Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle.** *Hum Reprod* 1992, **7**:876-882.
57. Koks C, Groothuis P, Dunselman G, de Goeij A, Evers J: **Adhesion of shed menstrual tissue in an in-vitro model using amnion and peritoneum: a light and electron microscopic study.** *Hum Reprod* 1999, **14**:816-822.

58. Van der Linden P, Erkens H, De Goeij A, Evers J, Duslman G: **Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes.** *Fertil Steril* 1996;76-80.
59. Groothuis P, Koks C, de Goeij A, Dunselman G, Arends J, Evers J: **Adhesion of human endometrium to the epithelial lining and extracellular matrix of amnion in vitro: an electron microscopic study.** *Hum Reprod* 1998, **13**:2275-2281.
60. Bruner K, Matrisian L, Rodgers W, Gorstein F, Osteen K: **Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice.** *J Clin Invest* 1997, **99**:2851-2857.
61. Koks C, Groothuis P, Slaats P, Dunselman G, de Goeij A, Evers J: **Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid.** *Fertil Steril* 2000, **73**:604-612.
62. Murphy A, Green W, Bobbie D, dela Cruz Z, Rock J: **Unsuspected endometriosis documented by scanning electron microscopy in visually normal peritoneum.** *Fertil Steril* 1986, **46**:522-524.
63. Murphy A, Nisolle M, Berliere M, Paindaveine B, Casnas-Roux F, Bourdon A, Donnez J: **Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women.** *Fertil Steril* 1990, **53**:984-988.
64. Redwine D: **'Invisible' microscopic endometriosis: a review.** *Gynecol Obstet Invest* 2003, **55**:63-67.
65. McLaren J: **Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis.** *Hum Reprod Update* 2000, **6**:45-55.
66. Martínez-Román S, Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Vilella R, Vanrell J: **Transferrin receptor (CD71) expression in peritoneal macrophages from fertile and infertile women with and without endometriosis.** *Am J Reprod Immunol* 1997, **38**:413-417.
67. Hill J, Faris H, Schiff I, Anderson D: **Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis.** *Fertil Steril* 1988, **50**:216-222.
68. Raiter-Tenenbaum A, Barañao R, Etchepareborda J, Meresman G, Rumi L: **Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis.** *Arch Gynecol Obstet* 1998, **261**:147-157.
69. Ho H, Wu M, Yang Y: **Peritoneal cellular immunity and endometriosis.** *Am J Reprod Immunol* 1997, **38**:400-412.
70. Iswasaki K, Makino T, Maruyama T, Matsubayashi H, Nozawa S: **Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis.** *Int J Fertil Menopausal Stud* 1993, **38**:229-234.
71. Oosterlynck D, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx P: **The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis.** *Fertil Steril* 1992, **58**:290-295.
72. Oosterlynck D, Meuleman C, Lacquet F, Waer M, Koninckx P: **Flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of women with endometriosis.** *Am J Reprod Immunol* 1994, **31**:25-31.
73. Ayers J, Friedman A: **Utero-tubal hypotonia associated with pelvic endometriosis.**, Abstracts of the scientific and poster sessions of the forty-first annual meeting of the American Fertility Society edition. pp. 131. Chicago: The American Fertility Society; 1985:131.
74. Salamanca A, Beltrán E: **Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis.** *Fertil Steril* 1995, **64**:193-195.

75. Giudice L, Kao L: **Endometriosis**. *Lancet* 2004, **364**:1789-1799.
76. Missmer S, Cramer D: **The epidemiology of endometriosis**. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003, **30**:1-19, vii.
77. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P: **Endometriosis: epidemiology and aetiological factors**. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004, **18**:177-200.
78. Vitonis A, Hankinson S, Hornstein M, Missmer S: **Adult physical activity and endometriosis risk**. *Epidemiology* 2010, **21**:16-23.
79. Simpson J, Elias S, Malinak L, Buttram VJ: **Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies**. *Am J Obstet Gynecol* 1980, **137**:327-331.
80. Moen M, Magnus P: **The familial risk of endometriosis**. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993, **72**:560-564.
81. Moen M: **Endometriosis in monozygotic twins**. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994, **73**:59-62.
82. Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S: **Endometriosis in monozygotic twins**. *Fertil Steril* 1997, **68**:941-942.
83. Medicine ASfR: **Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996**. *Fertil Steril* 1997, **67**:817-821.
84. Dastre A: **Fibrinolyse dans le sang**. *Arch Norm Pathol* 1893, **5**:661-673.
85. Collen D, Lijnen H: **Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis**. *Blood* 1991, **78**:3114-3124.
86. Lijnen H, Collen D: **Regulation of the fibrinolytic system**. In *Thrombolysis Yearbook*. Edited by A. G e. Amsterdam: Excerpta Medica; 1993: 1-23
87. Sappino A, Huarte J, Belin D, Vassalli J: **Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos**. *J Cell Biol* 1989, **109**:2471-2479.
88. Liu Y: **Regulation of the plasminogen activator system in the ovary**. *Biol Signals Recept* 1999, **8**:160-177.
89. Ny T, Peng X, Ohlsson M: **Hormonal regulation of the fibrinolytic components in the ovary**. *Thromb Res* 1993, **71**:1-45.
90. Parrilla J, Aznar J, Estelles A: **Letter: Fibrinolytic activity in the endometrial adenocarcinoma**. *Thromb Diath Haemorrh* 1975, **34**:864-866.
91. Pepper M, Sappino A, Stöcklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli J: **Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells**. *J Cell Biol* 1993, **122**:673-684.
92. Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, Johnsen M, Lund L, Ploug M, Rømer J: **Plasminogen activation and cancer**. *Thromb Haemost* 2005, **93**:676-681.
93. Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar S, Fuster C, Aznar J: **Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer**. *Clin Chem* 2002, **48**:1288-1295.
94. Bruse C, Bergqvist A, Carlström K, Fianu-Jonasson A, Lecander I, Astedt B: **Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women**. *Fertil Steril* 1998, **70**:821-826.
95. Ramón L, Gilabert-Estellés J, Castelló R, Gilabert J, España F, Romeu A, Chirivella M, Aznar J, Estellés A: **mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay**. *Hum Reprod* 2005, **20**:272-278.

96. Bajzar L, Manuel R, Nesheim M: **Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor.** *J Biol Chem* 1995, **270**:14477-14484.
97. Murray J, Buetow K, Donovan M, Hornung S, Motulsky A, Disteche C, Dyer K, Swisshelm K, Anderson J, Giblett E: **Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27.** *Am J Hum Genet* 1987, **40**:338-350.
98. Petersen T, Martzen M, Ichinose A, Davie E: **Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system.** *J Biol Chem* 1990, **265**:6104-6111.
99. McLean J, Tomlinson J, Kuang W, Eaton D, Chen E, Fless G, Scanu A, Lawn R: **cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen.** *Nature* 1987, **330**:132-137.
100. Forsgren M, Råden B, Israelsson M, Larsson K, Hedén L: **Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen.** *FEBS Lett* 1987, **213**:254-260.
101. Wiman B, Boman L, Collen D: **On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and a low-molecular-weight form of plasmin.** *Eur J Biochem* 1978, **87**:143-146.
102. Collen D: **On the regulation and control of fibrinolysis.** Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost* 1980, **43**:77-89.
103. Holvoet P, Lijnen H, Collen D: **A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen. Application to the study of the activation pathways of plasminogen in vivo.** *J Biol Chem* 1985, **260**:12106-12111.
104. Wiman B, Wallén P: **Activation of human plasminogen by an insoluble derivative of urokinase. Structural changes of plasminogen in the course of activation to plasmin and demonstration of a possible intermediate compound.** *Eur J Biochem* 1973, **36**:25-31.
105. Regañón E, Aznar J, Vila V: **Degradation of human fibrinogen by plasmin: isolation and partial characterization of an early degradation product.** *Haemostasis* 1978, **7**:26-34.
106. Saksela O, Rifkin D: **Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity.** *J Cell Biol* 1990, **110**:767-775.
107. Vassalli J, Sappino A, Belin D: **The plasminogen activator/plasmin system.** *J Clin Invest* 1991, **88**:1067-1072.
108. Plow E, Felez J, Miles L: **Cellular regulation of fibrinolysis.** *Thromb Haemost* 1991, **66**:32-36.
109. Bachmann F, Kruithof I: **Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects.** *Semin Thromb Hemost* 1984, **10**:6-17.
110. Ranby M, Wallen P: **Enzymatic properties of tissue-type plasminogen activator.** In *Thrombolysis, biological and therapeutic properties of new thrombolytic agents.* Edited by Verstraete M. Edimburg: Churchill Livingstone; 1985: 31-48
111. Rajput B, Degen S, Reich E, Waller E, Axelrod J, Eddy R, Shows T: **Chromosomal locations of human tissue plasminogen activator and urokinase genes.** *Science* 1985, **230**:672-674.
112. Riccio A, Grimaldi G, Verde P, Sebastio G, Boast S, Blasi F: **The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter.** *Nucleic Acids Res* 1985, **13**:2759-2771.

113. Holmes W, Pennica D, Blader M, Rey M, Guenzler W, Steffens G, Heyneker H: **Cloning and expression of the gen pro-urokinase in *Escherichia coli***. *Biotechnology* 1985, **3**:923-929.
114. Stump D, Lijnen H, Collen D: **Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator**. *J Biol Chem* 1986, **261**:17120-17126.
115. Lijnen H, Zamarron C, Blaber M, Winkler M, Collen D: **Activation of plasminogen by pro-urokinase. I. Mechanism**. *J Biol Chem* 1986, **261**:1253-1258.
116. Collen D, Zamarron C, Lijnen H, Hoylaerts M: **Activation of plasminogen by pro-urokinase. II. Kinetics**. *J Biol Chem* 1986, **261**:1259-1266.
117. Behrendt N, Rønne E, Ploug M, Petri T, Løber D, Nielsen L, Schleuning W, Blasi F, Appella E, Danø K: **The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH2-terminal amino acid sequence and glycosylation variants**. *J Biol Chem* 1990, **265**:6453-6460.
118. Ploug M, Rønne E, Behrendt N, Jensen A, Blasi F, Danø K: **Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol**. *J Biol Chem* 1991, **266**:1926-1933.
119. Dano K, Behrendt N, Brønner N, Ellis V, Ploug M, Pyke C: **The urokinase receptor: protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion**. *Fibrinolysis* 1994, **8**:189-203.
120. Pyke C, Eriksen J, Solberg H, Nielsen B, Kristensen P, Lund L, Danø K: **An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator**. *FEBS Lett* 1993, **326**:69-74.
121. Kristensen P, Eriksen J, Blasi F, Danø K: **Two alternatively spliced mouse urokinase receptor mRNAs with different histological localization in the gastrointestinal tract**. *J Cell Biol* 1991, **115**:1763-1771.
122. Laiho M, Keski-Oja J: **Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review**. *Cancer Res* 1989, **49**:2533-2553.
123. Roldan A, Cubellis M, Masucci M, Behrendt N, Lund L, Danø K, Appella E, Blasi F: **Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis**. *EMBO J* 1990, **9**:467-474.
124. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord J, Collen D, Mulligan R: **Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice**. *Nature* 1994, **368**:419-424.
125. Andreasen P, Kjøller L, Christensen L, Duffy M: **The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review**. *Int J Cancer* 1997, **72**:1-22.
126. Mazar A: **The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer**. *Anticancer Drugs* 2001, **12**:387-400.
127. Maupas-Schwalm F, Bedel A, Augé N, Grazide MH, Mucher E, Thiers JC, Salvayre R, Nègre-Salvayre A: **Integrin alpha(v)beta(3), metalloproteinases, and sphingomyelinase-2 mediate urokinase mitogenic effect**. *Cell Signal* 2009, **21**:1925-1934.
128. Chintala S, Mohanam S, Go Y, Venkaiah B, Sawaya R, Gokaslan Z, Rao J: **Altered in vitro spreading and cytoskeletal organization in human glioma cells by downregulation of urokinase receptor**. *Mol Carcinog* 1997, **20**:355-365.
129. Casslén B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert M, Lund L: **Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (u-PA) in endometrial stromal cells**

- by increasing its inhibitor and surface expression of the u-PA receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, **80**:2776-2784.
130. Bianchi E, Ferrero E, Fazioli F, Mangili F, Wang J, Bender J, Blasi F, Pardi R: **Integrin-dependent induction of functional urokinase receptors in primary T lymphocytes.** *J Clin Invest* 1996, **98**:1133-1141.
 131. Littlefield B: **Plasminogen activators in endometrial physiology and embryo implantation: a review.** *Ann N Y Acad Sci* 1991, **622**:167-175.
 132. Tabibzadeh S: **The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling.** *Mol Hum Reprod* 1996, **2**:77-92.
 133. Casslén B, Urano S, Lecander I, Ny T: **Plasminogen activators in the human endometrium, cellular origin and hormonal regulation.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992, **3**:133-138.
 134. Schatz F, Lockwood C: **Progesterone regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells.** *J Clin Endocrinol Metab* 1993, **77**:621-625.
 135. Soszka T, Olszewski K: **Plasminogen activators and their inhibitors in normal, hyperplastic and carcinomatous human endometrium.** *Thromb Res* 1986, **42**:835-846.
 136. Bulletti C, Jasonni V, Polli V, Cappuccini F, Galassi A, Flamigni C: **Basement membrane in human endometrium: possible role of proteolytic enzymes in developing hyperplasia and carcinoma.** *Ann N Y Acad Sci* 1991, **622**:376-382.
 137. Casslen B, Astedt B: **Plasminogen activation in ovarian cancer.** In *Fibrinolysis in disease*. Edited by Gals-Greenwalt P. Boca-Raton, (FL): CRC Press; 1995: 31-40
 138. Nagamine Y, Lee J, Menoud P, Nanbu R: **Structure and function of the urokinase-type plasminogen activator gene.** In *Fibrinolysis in disease*. Edited by Glas-Greenwalt P. Boca-Raton (FL): CRC Press 1995: 10-20
 139. Besser D, Verde P, Nagamine Y, Blasi F: **Signal transduction and the u-PA/u-PAR system.** *Fibrinolysis* 1996, **10**:215-237.
 140. Irigoyen J, Muñoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y: **The plasminogen activator system: biology and regulation.** *Cell Mol Life Sci* 1999, **56**:104-132.
 141. Verde P, Boast S, Franzè A, Robbiati F, Blasi F: **An upstream enhancer and a negative element in the 5' flanking region of the human urokinase plasminogen activator gene.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**:10699-10716.
 142. Cassady A, Stacey K, Nimmo K, Murphy K, von der Ahe D, Pearson D, Botteri F, Nagamine Y, Hume D: **Constitutive expression of the urokinase plasminogen activator gene in murine RAW264 macrophages involves distal and 5' non-coding sequences that are conserved between mouse and pig.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**:6839-6847.
 143. Yang B, Hauser C, Henkel G, Colman M, Van Beveren C, Stacey K, Hume D, Maki R, Ostrowski M: **Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:538-547.
 144. McCarthy S, Chen D, Yang B, Garcia Ramirez J, Cherwinski H, Chen X, Klagsbrun M, Hauser C, Ostrowski M, McMahon M: **Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:2401-2412.
 145. Karin M, Liu Z, Zandi E: **AP-1 function and regulation.** *Curr Opin Cell Biol* 1997, **9**:240-246.

146. Sugden P, Clerk A: **Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors.** *Cell Signal* 1997, **9**:337-351.
147. Shaw G, Kamen R: **A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.** *Cell* 1986, **46**:659-667.
148. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A: **Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:1670-1674.
149. Nanbu R, Montero L, D'Orazio D, Nagamine Y: **Enhanced stability of urokinase-type plasminogen activator mRNA in metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells and LLC-PK1 cells down-regulated for protein kinase C--correlation with cytoplasmic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C.** *Eur J Biochem* 1997, **247**:169-174.
150. Carmeliet P, Collen D: **Gene targeting and gene transfer studies of the plasminogen/plasmin system: implications in thrombosis, hemostasis, neointima formation, and atherosclerosis.** *FASEB J* 1995, **9**:934-938.
151. Loskutoff D, van Mourik J, Erickson L, Lawrence D: **Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**:2956-2960.
152. Bachmann F: **The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects.** *Thromb Haemost* 1995, **74**:172-179.
153. Heeb M, España F, Geiger M, Collen D, Stump D, Griffin J: **Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3.** *J Biol Chem* 1987, **262**:15813-15816.
154. España F, Berrettini M, Griffin J: **Purification and characterization of plasma protein C inhibitor.** *Thromb Res* 1989, **55**:369-384.
155. España F, Estellés A, Fernández P, Gilabert J, Sánchez-Cuenca J, Griffin J: **Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and blood plasma.** *Thromb Haemost* 1993, **70**:989-994.
156. Travis J, Salvesen G: **Human plasma proteinase inhibitors.** *Annu Rev Biochem* 1983, **52**:655-709.
157. Huber R, Carrell R: **Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins.** *Biochemistry* 1989, **28**:8951-8966.
158. Pemberton P: **The role of serpin superfamily members in cancer.** *The cancer journal* 1997, **10**:24-30.
159. Loskutoff D, Sawdey M, Mimuro J: **Type 1 plasminogen activator inhibitor.** In *Progress in Hemostasis and Thrombosis*. Edited by Coller B. Philadelphia: Saunders; 1988: 87-115
160. Loskutoff D: **Regulation of PAI-1 gene expression.** *Fibrinolysis* 1991, **5**:197-206.
161. Kawano T, Morimoto K, Uemura Y: **Urokinase inhibitor in human placenta.** *Nature* 1968, **217**:253-254.
162. Golder J, Stephens R: **Minactivin: a human monocyte product which specifically inactivates urokinase-type plasminogen activators.** *Eur J Biochem* 1983, **136**:517-522.
163. Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff D, Schleef R: **Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia.** *Blood* 1989, **74**:1332-1338.
164. Kruithof E, Baker M, Bunn C: **Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2.** *Blood* 1995, **86**:4007-4024.
165. España F, Estellés A, Gilabert J, Andrés C, Aznar J: **Inhibidores de la proteína C.** *Rev Iber Tromb Hemostasia* 1989, **2**:29-32.

166. Geiger M, Priglinger U, Griffin J, Binder B: **Urinary protein C inhibitor. Glycosaminoclycans synthesized by the epithelial kidney cell line TCL-598 enhance its interaction with urokinase.** *J Biol Chem* 1991, **266**:11851-11857.
167. Suzuki K, Nishioka J, Kusumoto H, Hashimoto S: **Mechanism of inhibition of activated protein C by protein C inhibitor.** *J Biochem* 1984, **95**:187-195.
168. Meijers J, Kanters D, Vlooswijk R, van Erp H, Hessing M, Bouma B: **Inactivation of human plasma kallikrein and factor XIa by protein C inhibitor.** *Biochemistry* 1988, **27**:4231-4237.
169. Geiger M, Huber K, Wojta J, Stingl L, Espana F, Griffin J, Binder B: **Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo.** *Blood* 1989, **74**:722-728.
170. Suzuki K: **Activated protein C inhibitor.** *Semin Thromb Hemost* 1984, **10**:154-161.
171. Hermans J, Jones R, Stone S: **Rapid inhibition of the sperm protease acrosin by protein C inhibitor.** *Biochemistry* 1994, **33**:5440-5444.
172. España F, Gilabert J, Estellés A, Romeu A, Aznar J, Cabo A: **Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen.** *Thromb Res* 1991, **64**:309-320.
173. Ginsburg D, Zeheb R, Yang A, Rafferty U, Andreasen P, Nielsen L, Dano K, Lebo R, Gelehrter T: **cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells.** *J Clin Invest* 1986, **78**:1673-1680.
174. Bosma P, van den Berg E, Kooistra T, Siemieniak D, Slightom J: **Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences.** *J Biol Chem* 1988, **263**:9129-9141.
175. Ny T, Sawdey M, Lawrence D, Millan J, Loskutoff D: **Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:6776-6780.
176. Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij C, van Zonneveld A, van Mourik J: **Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family.** *EMBO J* 1986, **5**:2539-2544.
177. Kruithof E: **Plasminogen activator inhibitors--a review.** *Enzyme* 1988, **40**:113-121.
178. Kooistra T, Sprengers E, van Hinsbergh V: **Rapid inactivation of the plasminogen-activator inhibitor upon secretion from cultured human endothelial cells.** *Biochem J* 1986, **239**:497-503.
179. Kruithof E, Tran-Thang C, Ransijn A, Bachmann F: **Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma.** *Blood* 1984, **64**:907-913.
180. Erickson L, Ginsberg M, Loskutoff D: **Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets.** *J Clin Invest* 1984, **74**:1465-1472.
181. Sprengers E, Akkerman J, Jansen B: **Blood platelet plasminogen activator inhibitor: two different pools of endothelial cell type plasminogen activator inhibitor in human blood.** *Thromb Haemost* 1986, **55**:325-329.
182. Hekman C, Loskutoff D: **Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants.** *J Biol Chem* 1985, **260**:11581-11587.
183. Lindahl T, Ohlsson P, Wiman B: **The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator.** *Biochem J* 1990, **265**:109-113.

184. Owensby D, Morton P, Wun T, Schwartz A: **Binding of plasminogen activator inhibitor type-1 to extracellular matrix of Hep G2 cells. Evidence that the binding protein is vitronectin.** *J Biol Chem* 1991, **266**:4334-4340.
185. Cubellis M, Wun T, Blasi F: **Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1.** *EMBO J* 1990, **9**:1079-1085.
186. Mimuro J, Schleef R, Loskutoff D: **Extracellular matrix of cultured bovine aortic endothelial cells contains functionally active type 1 plasminogen activator inhibitor.** *Blood* 1987, **70**:721-728.
187. Tucker H, Mottonen J, Goldsmith E, Gerard R: **Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition.** *Nat Struct Biol* 1995, **2**:442-445.
188. Ehrlich H, Keijer J, Preissner K, Gebbink R, Pannekoek H: **Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin.** *Biochemistry* 1991, **30**:1021-1028.
189. Wagner O, de Vries C, Hohmann C, Veerman H, Pannekoek H: **Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA.** *J Clin Invest* 1989, **84**:647-655.
190. Reilly C, Hutzelmann J: **Plasminogen activator inhibitor-1 binds to fibrin and inhibits tissue-type plasminogen activator-mediated fibrin dissolution.** *J Biol Chem* 1992, **267**:17128-17135.
191. Stringer H, Pannekoek H: **The significance of fibrin binding by plasminogen activator inhibitor 1 for the mechanism of tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis.** *J Biol Chem* 1995, **270**:11205-11208.
192. Riccio A, Lund L, Sartorio R, Lania A, Andreasen P, Danø K, Blasi F: **The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**:2805-2824.
193. van Zonneveld A, Curriden S, Loskutoff D: **Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:5525-5529.
194. Lee W, Mitchell P, Tjian R: **Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements.** *Cell* 1987, **49**:741-752.
195. Rauscher Fr, Cohen D, Curran T, Bos T, Vogt P, Bohmann D, Tjian R, Franza BJ: **Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene.** *Science* 1988, **240**:1010-1016.
196. Brenner D, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M: **Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha.** *Nature* 1989, **337**:661-663.
197. Kim S, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim K, Sporn M, Karin M, Roberts A: **Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex.** *Mol Cell Biol* 1990, **10**:1492-1497.
198. Kunz C, Pebler S, Otte J, von der Ahe D: **Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**:3710-3717.
199. Lund L, Riccio A, Andreasen P, Nielsen L, Kristensen P, Laiho M, Saksela O, Blasi F, Danø K: **Transforming growth factor-beta is a strong and fast acting positive regulator of the level of type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA in WI-38 human lung fibroblasts.** *EMBO J* 1987, **6**:1281-1286.

200. Pepper M, Ferrara N, Orci L, Montesano R: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **181**:902-906.
201. Seki T, Gelehrter T: **Interleukin-1 induction of type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene expression in the mouse hepatocyte line, AML 12.** *J Cell Physiol* 1996, **168**:648-656.
202. Sandberg T, Eriksson P, Gustavsson B, Casslén B: **Differential regulation of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene expression by growth factors and progesterone in human endometrial stromal cells.** *Mol Hum Reprod* 1997, **3**:781-787.
203. Yamashita M: **Tumor necrosis factor alpha is involved in the induction of plasminogen activator inhibitor-1 by endotoxin.** *Thromb Res* 1997, **87**:165-170.
204. Westerhausen DJ, Hopkins W, Billadello J: **Multiple transforming growth factor-beta-inducible elements regulate expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene in Hep G2 cells.** *J Biol Chem* 1991, **266**:1092-1100.
205. Juhan-Vague I, Alessi M, Joly P, Thirion X, Vague P, Declercq P, Serradimigni A, Collen D: **Plasma plasminogen activator inhibitor-1 in angina pectoris. Influence of plasma insulin and acute-phase response.** *Arteriosclerosis* 1989, **9**:362-367.
206. Pinsky D, Liao H, Lawson C, Yan S, Chen J, Carmeliet P, Loskutoff D, Stern D: **Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition.** *J Clin Invest* 1998, **102**:919-928.
207. Heaton J, Tillmann-Bogush M, Leff N, Gelehrter T: **Cyclic nucleotide regulation of type-1 plasminogen activator-inhibitor mRNA stability in rat hepatoma cells. Identification of cis-acting sequences.** *J Biol Chem* 1998, **273**:14261-14268.
208. Guan Y, Carlberg M, Bruse C, Carlström K, Bergqvist A: **Effects of hormones on uPA, PAI-1 and suPAR from cultured endometrial and ovarian endometriotic stromal cells.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002, **81**:389-397.
209. Kruithof E, Tran-Thang C, Gudinchet A, Hauert J, Nicoloso G, Genton C, Welte H, Bachmann F: **Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors.** *Blood* 1987, **69**:460-466.
210. Estellés A, Gilabert J, Andrés C, España F, Aznar J: **Plasminogen activator inhibitors type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy.** *Thromb Haemost* 1990, **64**:281-285.
211. Estellés A, Gilabert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, Grancha S, España F, Loskutoff D, Schleaf R: **Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation.** *Blood* 1994, **84**:143-150.
212. Vicente V, Rodríguez C, Soto I, Fernández M, Moraleda J: **Risk of thrombosis during pregnancy and post-partum in hereditary thrombophilia.** *Am J Hematol* 1994, **46**:151-152.
213. Estellés A, Gilabert J, España F, Gómez-Lechón M: **Fibrinolysis in preeclampsia.** *Fibrinolysis* 1987, **1**:209-214.
214. Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Galbis M: **Fibrinolytic parameters in normotensive pregnancy with intrauterine fetal growth retardation and in severe preeclampsia.** *Am J Obstet Gynecol* 1991, **165**:138-142.
215. Gilabert J, Estellés A, Grancha S, España F, Aznar J: **Fibrinolytic system and reproductive process with special reference to fibrinolytic failure in pre-eclampsia.** *Hum Reprod* 1995, **10 Suppl 2**:121-131.

216. Estellés A, Grancha S, Gilabert J, Thinnes T, Chirivella M, España F, Aznar J, Loskutoff D: **Abnormal expression of plasminogen activator inhibitors in patients with gestational trophoblastic disease.** *Am J Pathol* 1996, **149**:1229-1239.
217. Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi M, Aillaud M, Ansaldi J, Philip-Joet C, Holvoet P, Serradimigni A, Collen D: **Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis.** *Thromb Haemost* 1987, **57**:67-72.
218. Taberner M, Estellés A, Vicente V, Alberca I, Aznar J: **Incidence of increased plasminogen activator inhibitor in patients with deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism.** *Thromb Res* 1989, **56**:565-570.
219. Estellés A, Tormo G, Aznar J, España F, Tormo V: **Reduced fibrinolytic activity in coronary heart disease in basal conditions and after exercise.** *Thromb Res* 1985, **40**:373-383.
220. Almér L, Ohlin H: **Elevated levels of the rapid inhibitor of plasminogen activator (t-PAI) in acute myocardial infarction.** *Thromb Res* 1987, **47**:335-339.
221. Aznar J, Estellés A, Tormo G, Sapena P, Tormo V, Blanch S, España F: **Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease.** *Br Heart J* 1988, **59**:535-541.
222. Estellés A, Aznar J, Tormo G, Sapena P, Tormo V, España F: **Influence of a rehabilitation sports programme on the fibrinolytic activity of patients after myocardial infarction.** *Thromb Res* 1989, **55**:203-212.
223. Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, Ramón L, Cosín R, Estellés A: **Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms.** *Curr Med Chem* 2008, **15**:923-929.
224. Jankun J, Merrick H, Goldblatt P: **Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers.** *J Cell Biochem* 1993, **53**:135-144.
225. Harbeck N, Krüger A, Sinz S, Kates R, Thomssen C, Schmitt M, Jänicke F: **Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1--a multifaceted proteolytic factor.** *Onkologie* 2001, **24**:238-244.
226. Palmieri D, Lee J, Juliano R, Church F: **Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**:40950-40957.
227. Ruiz M, Marugan I, Estellés A, Navarro I, España F, Alberola V, San Juan L, Aznar J, Garcia-Conde J: **The influence of chemotherapy on plasma coagulation and fibrinolytic systems in lung cancer patients.** *Cancer* 1989, **63**:643-648.
228. Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H: **Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 1993, **24**:195-208.
229. Parrilla J, Aznar J, Díez E: **Actividad fibrinolítica del endometrio.** *Tokoginecol Pract* 1972, **31**:391.
230. Fasciani A, Bocci G, Xu J, Bielecki R, Greenblatt E, Leyland N, Casper R: **Three-dimensional in vitro culture of endometrial explants mimics the early stages of endometriosis.** *Fertil Steril* 2003, **80**:1137-1143.
231. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S: **Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity.** *Arterioscler Thromb* 1991, **11**:183-190.
232. Dawson S, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney A: **The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator**

- inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993, **268**:10739-10745.**
233. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft F, Båvenholm P, Hamsten A: **Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:1851-1855.
234. Grancha S, Estellés A, Tormo G, Falco C, Gilabert J, España F, Cano A, Segui R, Aznar J: **Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter 4G/5G genotype and increased PAI-1 circulating levels in postmenopausal women with coronary artery disease.** *Thromb Haemost* 1999, **81**:516-521.
235. Kohler H, Grant P: **Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.** *N Engl J Med* 2000, **342**:1792-1801.
236. Henry M, Tregouët D, Alessi M, Aillaud M, Visvikis S, Siest G, Tiret L, Juhan-Vague I: **Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: a family study with part of the Stanislas Cohort.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, **18**:84-91.
237. Glueck C, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontaine R, Moore S, Sieve-Smith L, Tracy T: **The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications.** *Metabolism* 2000, **49**:845-852.
238. Ricart J, Ramón L, Vayá A, España F, Santaolaria M, Todolí J, Castelló R, Fontcuberta J, Estellés A: **Fibrinolytic inhibitor levels and polymorphisms in Behçet disease and their association with thrombosis.** *Br J Haematol* 2008, **141**:716-719.
239. Zorio E, Falco C, Arnau M, España F, Osa A, Ramon L, Castello R, Almenar L, Palencia M, Estelles A: **Lipoprotein (a) in young individuals as a marker of the presence of ischemic heart disease and the severity of coronary lesions.** *Haematologica* 2006, **91**:562-565.
240. Estellés A, Dalmau J, Falcó C, Berbel O, Castelló R, España F, Aznar J: **Plasma PAI-1 levels in obese children--effect of weight loss and influence of PAI-1 promoter 4G/5G genotype.** *Thromb Haemost* 2001, **86**:647-652.
241. Solá E, Vayá A, España F, Castelló R, Ramón L, Hernández-Mijares A, Vicente V, Estellés A: **Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4G/5G polymorphism.** *Thromb Res* 2008, **122**:320-327.
242. Estellés A, Zorio E, Gilabert-Estellés J, Ramón L, Braza Boils A, España F: **Fibrinolisis y enfermedades endocrinas.** *haematologica/edición española* 2009, **94**(Extra1):412-418.
243. Sillem M, Prifti S, Monga B, Buvari P, Shamia U, Runnebaum B: **Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is over-expressed in uterine endometrium from women with endometriosis.** *Mol Hum Reprod* 1997, **3**:1101-1105.
244. Danø K, Andreasen P, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen L, Skriver L: **Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer.** *Adv Cancer Res* 1985, **44**:139-266.
245. Páramo J, Orbe J: **Hemostasis, inflammation and cardiovascular disease.** *Clin Lab* 2002, **48**:463-470.
246. Carmeliet P, Coolen D: **Targeted gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation system in mice.** *Fibrinolysis* 1996, **2**:73-84.
247. Carmeliet P, Moons L, Collen D: **Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis.** *Cardiovasc Res* 1998, **39**:8-33.

248. Johnsen M, Lund L, Rømer J, Almholt K, Danø K: **Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**:667-671.
249. Mignatti P, Robbins E, Rifkin D: **Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade.** *Cell* 1986, **47**:487-498.
250. Cajot J, Schleuning W, Medcalf R, Bamat J, Testuz J, Liebermann L, Sordat B: **Mouse L cells expressing human prourokinase-type plasminogen activator: effects on extracellular matrix degradation and invasion.** *J Cell Biol* 1989, **109**:915-925.
251. Hollas W, Blasi F, Boyd D: **Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer.** *Cancer Res* 1991, **51**:3690-3695.
252. Laug W, Cao X, Yu Y, Shimada H, Kruithof E: **Inhibition of invasion of HT1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2.** *Cancer Res* 1993, **53**:6051-6057.
253. Quattrone A, Fibbi G, Anichini E, Pucci M, Zamperini A, Capaccioli S, Del Rosso M: **Reversion of the invasive phenotype of transformed human fibroblasts by anti-messenger oligonucleotide inhibition of urokinase receptor gene expression.** *Cancer Res* 1995, **55**:90-95.
254. Alizadeh H, Ma D, Berman M, Bellingham D, Comerford S, Gething M, Sambrook J, Niederhorn J: **Tissue-type plasminogen activator-induced invasion and metastasis of murine melanomas.** *Curr Eye Res* 1995, **14**:449-458.
255. Ma D, Gerard R, Li X, Alizadeh H, Niederhorn J: **Inhibition of metastasis of intraocular melanomas by adenovirus-mediated gene transfer of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in an athymic mouse model.** *Blood* 1997, **90**:2738-2746.
256. Castelló R, Landete J, España F, Vázquez C, Fuster C, Almenar S, Ramón L, Radtke K, Estellés A: **Expression of plasminogen activator inhibitors type 1 and type 3 and urokinase plasminogen activator protein and mRNA in breast cancer.** *Thromb Res* 2007, **120**:753-762.
257. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brüner N, Jänicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, et al: **The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients.** *Cancer Res* 2000, **60**:636-643.
258. Look M, van Putten W, Duffy M, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, et al: **Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in breast cancer patients.** *Thromb Haemost* 2003, **90**:538-548.
259. Bajou K, Noël A, Gerard R, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig N, Carmeliet P, Collen D, Foidart J: **Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization.** *Nat Med* 1998, **4**:923-928.
260. Loskutoff D, Curriden S, Hu G, Deng G: **Regulation of cell adhesion by PAI-1.** *APMIS* 1999, **107**:54-61.
261. Webb D, Thomas K, Gonias S: **Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth.** *J Cell Biol* 2001, **152**:741-752.
262. Kirkland J, Murthy L, Stancel G: **Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus.** *Endocrinology* 1992, **130**:3223-3230.

263. Marbaix E, Donnez J, Courtoy P, Eeckhout Y: **Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:11789-11793.
264. Farrar J, Carson D: **Differential temporal and spatial expression of mRNA encoding extracellular matrix components in decidua during the peri-implantation period.** *Biol Reprod* 1992, **46**:1095-1108.
265. Zhu H, Huang J, Mazela J, Elias J, Tseng L: **Progestin stimulates the biosynthesis of fibronectin and accumulation of fibronectin mRNA in human endometrial stromal cells.** *Hum Reprod* 1992, **7**:141-146.
266. Casslén B, Astedt B: **Occurrence of both urokinase and tissue plasminogen activator in the human endometrium.** *Contraception* 1983, **28**:553-564.
267. Casslén B, Andersson A, Nilsson I, Astedt B: **Hormonal regulation of the release of plasminogen activators and of a specific activator inhibitor from endometrial tissue in culture.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1986, **182**:419-424.
268. Casslén B, Urano S, Ny T: **Progesterone regulation of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) antigen and mRNA levels in human endometrial stromal cells.** *Thromb Res* 1992, **66**:75-87.
269. Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy P: **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 U S A* 1996, **93**:9120-9125.
270. Rybo G: **Plasminogen activators in the endometrium. I. Methodological aspects.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 1966, **45**:411-428.
271. Rybo G: **Plasminogen activators in the endometrium. II. Clinical aspects. Variation in the concentration of plasminogen activators during the menstrual cycle and its relation to menstrual blood loss.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 1966, **45**:429-450.
272. Casslén B, Thorell J, Astedt B: **Effect of IUD on urokinase-like immunoreactivity and plasminogen activators in human uterine fluid.** *Contraception* 1981, **23**:435-445.
273. Koh S, Wong P, Yuen R, Chua S, Ng B, Ratnam S: **Concentration of plasminogen activators and inhibitor in the human endometrium at different phases of the menstrual cycle.** *J Reprod Fertil* 1992, **96**:407-413.
274. Niedbala M, Sartorelli A: **Regulation by epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediated proteolysis of extracellular matrix.** *Cancer Res* 1989, **49**:3302-3309.
275. Hébert C, Baker J: **Linkage of extracellular plasminogen activator to the fibroblast cytoskeleton: colocalization of cell surface urokinase with vinculin.** *J Cell Biol* 1988, **106**:1241-1247.
276. Pöllänen J, Hedman K, Nielsen L, Danø K, Vaheri A: **Ultrastructural localization of plasma membrane-associated urokinase-type plasminogen activator at focal contacts.** *J Cell Biol* 1988, **106**:87-95.
277. Finlay T, Katz J, Kirsch L, Levitz M, Nathoo S, Seiler S: **Estrogen-stimulated uptake of plasminogen by the mouse uterus.** *Endocrinology* 1983, **112**:856-861.
278. Feinberg R, Kao L, Haimowitz J, Queenan JJ, Wun T, Strauss Jr, Kliman H: **Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts.** *Lab Invest* 1989, **61**:20-26.
279. Fernández-Shaw S, Marshall J, Hicks B, Barlow D, Starkey P: **Plasminogen activators in ectopic and uterine endometrium.** *Fertil Steril* 1995, **63**:45-51.
280. Gleeson N, Gonsalves R, Bonnar J: **Plasminogen activator inhibitors in uterine and peritoneal fluids of women with endometriosis.** *Fertil Steril* 1993, **47**:218-224.

281. Wild R, Zhang R, Medders D: **Whole endometrial fragments form characteristics of in vivo endometriosis in a mesothelial cell co-culture system: an in vitro model for the study of the histogenesis of endometriosis.** *J Soc Gynecol Investig* 1994, **1**:65-68.
282. Evers J, Dunselman G, Linden P, Land J: **New concepts on the etiology of endometriosis.** In *Fertility and sterility A current overview*. Edited by Hedon B, Bringer J, Mares P. Montpellier: The Parthenon Publishing Group; 1995: 57-62
283. Carlström K, Bergqvist A, Ljungberg O: **Metabolism of estrone sulfate in endometriotic tissue and in uterine endometrium in proliferative and secretory cycle phase.** *Fertil Steril* 1988, **49**:229-233.
284. Bergqvist A, Fernö M: **Oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison of different cycle phases and ages.** *Hum Reprod* 1993, **8**:2211-2217.
285. Bulun S, Zeitoun K, Takayama K, Sasano H: **Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance.** *J Mol Endocrinol* 2000, **25**:35-42.
286. Bergqvist A, Jeppsson S, Kullander S, Ljungberg O: **Human uterine endometrium and endometriotic tissue transplanted into nude mice. Morphologic effects of various steroid hormones.** *Am J Pathol* 1985, **121**:337-341.
287. Rock J, Prendergast R, Bobbie D, Green W, Parmley T, Dubin N: **Intraocular endometrium in the rabbit as a model for endometriosis.** *Fertil Steril* 1993, **59**:232-235.
288. Dizerega G, Barber D, Hodgen G: **Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression.** *Fertil Steril* 1980, **33**:649-653.
289. Buckman R, Woods M, Sargent L, Gervin A: **A unifying pathogenetic mechanism in the etiology of intraperitoneal adhesions;.** *J Surg Res* 1976, **20**:1-5.
290. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G: **Fibrinogen.** *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**:741-746.
291. Lijnen H: **Elements of the fibrinolytic system.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **936**:226-236.
292. Topley N, Mackenzie R, Williams J: **Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis.** *Immunobiology* 1996, **195**:563-573.
293. Holmdahl L, Ivarsson M: **The role of cytokines, coagulation, and fibrinolysis in peritoneal tissue repair.** *Eur J Surg* 1999, **165**:1012-1019.
294. Bugge T, Flick M, Danton M, Daugherty C, Romer J, Dano K, Carmeliet P, Collen D, Degen J: **Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:5899-5904.
295. Holmdahl L, Eriksson E, Eriksson B, Risberg B: **Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma.** *Surgery* 1998, **123**:539-544.
296. Evans D, McAree K, Guyton D, Hawkins N, Stakleff K: **Dose dependency and wound healing aspects of the use of tissue plasminogen activator in the prevention of intra-abdominal adhesions.** *Am J Surg* 1993, **165**:229-232.
297. Tsuji K, Eguchi Y, Kodama M: **Postoperative hypercoagulable state followed by hyperfibrinolysis related to wound healing after hepatic resection.** *J Am Coll Surg* 1996, **183**:230-238.
298. Lai H, Chen Y, Chang K, Chen W: **Tissue plasminogen activator reduces intraperitoneal adhesion after intestinal resection in rats.** *J Formos Med Assoc* 1998, **97**:323-327.
299. Edelstam G, Lecander I, Larsson B, Astedt B: **Fibrinolysis in the peritoneal fluid during adhesions, endometriosis and ongoing pelvic inflammatory disease.** *Inflammation* 1998, **22**:341-351.

300. Falk K, Björquist P, Strömquist M, Holmdahl L: **Reduction of experimental adhesion formation by inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1.** *Br J Surg* 2001, **88**:286-289.
301. Dunselman G, Bouckaert P, van Wersch J, Brommer E, Evers J: **Fibrinolytic properties of peritoneal fluid in endometriosis.** *Gynecol Obstet Invest* 1988, **26**:302-307.
302. Batzofin J, Holmes S, Gibbons W, Buttram VJ: **Peritoneal fluid plasminogen activator activity in endometriosis and pelvic adhesive disease.** *Fertil Steril* 1985, **44**:277-279.
303. Astedt B, Nordenskjöld F: **Plasminogen activators in endometriosis.** *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1984, **123**:23-24.
304. Bissell M, Hall H, Parry G: **How does the extracellular matrix direct gene expression?** *J Theor Biol* 1982, **99**:31-68.
305. Ingber D: **Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis.** *J Cell Biochem* 1991, **47**:236-241.
306. Martins-Green M, Bissell M: **Cell extracellular matrix interactions in development.** *Semin Dev Biol* 1995, **6**:149-159.
307. Bonewald L: **Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta.** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999, **9**:33-44.
308. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J: **Adhesión celular, uniones celulares y matriz extracelular.** In *Biología Molecular de la Célula*. 3ª edition: OMEGA; 1996
309. van der Rest M, Garrone R: **Collagen family of proteins.** *FASEB J* 1991, **5**:2814-2823.
310. Aplin JD, Charlton AK, Ayad S: **An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy.** *Cell Tissue Res* 1988, **253**:231-240.
311. Tanaka T, Wang C, Umesaki N: **Autocrine/paracrine regulation of human endometrial stromal remodeling by laminin and type IV collagen.** *Int J Mol Med* 2008, **22**:581-587.
312. Tanaka T, Wang C, Umesaki N: **Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen.** *Int J Mol Med* 2009, **23**:173-180.
313. Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M, Nakano R: **Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium.** *J Reprod Fertil* 1996, **108**:147-155.
314. Park C, Zhang H, Pallavicini M, Gray J, Baehner F, Park C, Bissell M: **Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo.** *Cancer Res* 2006, **66**:1526-1535.
315. Zhao X, Wang D, Zhao Z, Xiao Y, Sengupta S, Zhang R, Lauber K, Wesselborg S, Feng L, Rose TM, et al: **Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**:29357-29368.
316. Edick MJ, Tesfay L, Lamb LE, Knudsen BS, Miranti CK: **Inhibition of integrin-mediated crosstalk with epidermal growth factor receptor/Erk or Src signaling pathways in autophagic prostate epithelial cells induces caspase-independent death.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:2481-2490.
317. Stenbäck F: **Collagen type III formation and distribution in the uterus: effects of hormones and neoplasm development.** *Oncology* 1989, **46**:326-334.
318. Gordon MK, Hahn RA: **Collagens.** *Cell Tissue Res* 2010, **339**:247-257.
319. Stovall DW, Anners JA, Halme J: **Immunohistochemical detection of type I, III, and IV collagen in endometriosis implants.** *Fertil Steril* 1992, **57**:984-989.

320. Jokimaa V, Oksjoki S, Kujari H, Vuorio E, Anttila L: **Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages.** *Mol Hum Reprod* 2002, **8**:1111-1116.
321. Yaoi Y, Hashimoto K, Takahara K, Kato I: **Insulin binds to type V collagen with retention of mitogenic activity.** *Exp Cell Res* 1991, **194**:180-185.
322. LeBaron RG, Höök A, Esko JD, Gay S, Höök M: **Binding of heparan sulfate to type V collagen. A mechanism of cell-substrate adhesion.** *J Biol Chem* 1989, **264**:7950-7956.
323. Soker S, Goldstaub D, Svahn CM, Vlodavsky I, Levi BZ, Neufeld G: **Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **203**:1339-1347.
324. Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB: **Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation.** *J Cell Biol* 1988, **107**:743-751.
325. Vigny M, Ollier-Hartmann MP, Lavigne M, Fayein N, Jeanny JC, Laurent M, Courtois Y: **Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane-like structures and to purified heparan sulfate proteoglycan of the EHS tumor.** *J Cell Physiol* 1988, **137**:321-328.
326. Mumby SM, Raugi GJ, Bornstein P: **Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: selective binding to type V collagen.** *J Cell Biol* 1984, **98**:646-652.
327. Mylona P, Kielty CM, Hoyland JA, Aplin JD: **Expression of type VI collagen mRNAs in human endometrium during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy.** *J Reprod Fertil* 1995, **103**:159-167.
328. Wewer UM, Faber M, Liotta LA, Albrechtsen R: **Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells.** *Lab Invest* 1985, **53**:624-633.
329. Faber M, Wewer UM, Berthelsen JG, Liotta LA, Albrechtsen R: **Laminin production by human endometrial stromal cells relates to the cyclic and pathologic state of the endometrium.** *Am J Pathol* 1986, **124**:384-391.
330. Kisalva LL, Herr JC, Little CD: **Immunolocalization of extracellular matrix proteins and collagen synthesis in first-trimester human decidua.** *Anat Rec* 1987, **218**:402-415.
331. Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Nakano R: **Decreased type IV collagen expression by human decidual tissues in spontaneous abortion.** *J Clin Endocrinol Metab* 1996, **81**:2925-2929.
332. Brar AK, Frank GR, Richards RG, Meyer AJ, Kessler CA, Cedars MI, Klein DJ, Handwerger S: **Laminin decreases PRL and IGFBP-1 expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells.** *J Cell Physiol* 1995, **163**:30-37.
333. Mizuno K, Tanaka T, Umesaki N, Ogita S: **Inhibition of cAMP-mediated decidualization in human endometrial stromal cells by IL-1beta and laminin.** *Horm Metab Res* 1999, **31**:307-310.
334. Nagase H, Woessner J: **Matrix metalloproteinases.** *J Biol Chem* 1999, **274**:21491-21494.
335. Murphy G, Knäuper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, Freije J, Pendás A, López-Otín C: **Evaluation of some newer matrix metalloproteinases.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **878**:25-39.
336. Johansson N, Ahonen M, Kähäri V: **Matrix metalloproteinases in tumor invasion.** *Cell Mol Life Sci* 2000, **57**:5-15.

337. Nagase H, Enghild J, Suzuki K, Salvesen G: **Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate.** *Biochemistry* 1990, **29**:5783-5789.
338. Koklitis P, Murphy G, Sutton C, Angal S: **Purification of recombinant human prostromelysin. Studies on heat activation to give high-Mr and low-Mr active forms, and a comparison of recombinant with natural stromelysin activities.** *Biochem J* 1991, **276 (Pt 1)**:217-221.
339. Duffy M, Maguire T, Hill A, McDermott E, O'Higgins N: **Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis.** *Breast Cancer Res* 2000, **2**:252-257.
340. Patterson M, Atkinson S, Knäuper V, Murphy G: **Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain.** *FEBS Lett* 2001, **503**:158-162.
341. Nagase H, Visse R, Murphy G: **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.** *Cardiovasc Res* 2006, **69**:562-573.
342. Birkedal-Hansen H, Moore W, Bodden M, Windsor L, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler J: **Matrix metalloproteinases: a review.** *Crit Rev Oral Biol Med* 1993, **4**:197-250.
343. Chandler S, Miller K, Clements J, Lury J, Corkill D, Anthony D, Adams S, Gearing A: **Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview.** *J Neuroimmunol* 1997, **72**:155-161.
344. Ashworth J, Murphy G, Rock M, Sherratt M, Shapiro S, Shuttleworth C, Kielty C: **Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling.** *Biochem J* 1999, **340 (Pt 1)**:171-181.
345. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen I, Enghild J, Sasaguri Y, Mori Y: **Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases.** *J Biol Chem* 1996, **271**:14657-14660.
346. Lijnen H, Ugwu F, Bini A, Collen D: **Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3).** *Biochemistry* 1998, **37**:4699-4702.
347. Pei D, Weiss S: **Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.** *Nature* 1995, **375**:244-247.
348. Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P: **Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**:25527-25536.
349. Marchenko N, Marchenko G, Weinreb R, Lindsey J, Kyshtoobayeva A, Crawford H, Strongin A: **Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**:942-956.
350. Herrmann G, Wlaschek M, Lange T, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K: **UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts.** *Exp Dermatol* 1993, **2**:92-97.
351. Nagase H: **Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** *Biol Chem* 1997, **378**:151-160.
352. Van Wart H, Birkedal-Hansen H: **The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:5578-5582.
353. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T: **Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.** *Mol Cell Biochem* 2003, **253**:269-285.

354. HE C, Wilhelm S, Pentland A, Marmer B, Grant G, Eisen A, Goldberg G: **Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:2632-2636.
355. Suzuki K, Enghild J, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H: **Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin).** *Biochemistry* 1990, **29**:10261-10270.
356. Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T: **Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties.** *J Biol Chem* 1992, **267**:21712-21719.
357. Ogata Y, Enghild J, Nagase H: **Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9.** *J Biol Chem* 1992, **267**:3581-3584.
358. Gomez D, Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson U: **Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.** *Eur J Cell Biol* 1997, **74**:111-122.
359. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H: **Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1477**:267-283.
360. Woessner JJ: **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.** *FASEB J* 1991, **5**:2145-2154.
361. Rodgers W, Matrisian L, Giudice L, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen K: **Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones.** *J Clin Invest* 1994, **94**:946-953.
362. Salamonsen L, Woolley D: **Matrix metalloproteinases in normal menstruation.** *Hum Reprod* 1996, **11 Suppl 2**:124-133.
363. Curry TJ, Osteen K: **Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus.** *Biol Reprod* 2001, **64**:1285-1296.
364. Osteen K, Rodgers W, Gaire M, Hargrove J, Gorstein F, Matrisian L: **Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:10129-10133.
365. Osteen K, Keller N, Feltus F, Melner M: **Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal human endometrium.** *Gynecol Obstet Invest* 1999, **48 Suppl 1**:2-13.
366. Schatz F, Papp C, Toth-Pal E, Lockwood C: **Ovarian steroid-modulated stromelysin-1 expression in human endometrial stromal and decidual cells.** *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **78**:1467-1472.
367. Rudolph-Owen L, Slayden O, Matrisian L, Brenner R: **Matrix metalloproteinase expression in *Macaca mulatta* endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients.** *Biol Reprod* 1998, **59**:1349-1359.
368. Matrisian L, Gaire M, Rodgers W, Osteen K: **Metalloproteinase expression and hormonal regulation during tissue remodeling in the cycling human endometrium.** *Contrib Nephrol* 1994, **107**:94-100.
369. Woessner JJ: **Regulation of matrilysin in the rat uterus.** *Biochem Cell Biol* 1996, **74**:777-784.
370. Huang H, Wen Y, Irwin J, Kruessel J, Soong Y, Polan M: **Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells.** *J Clin Endocrinol Metab* 1998, **83**:1721-1729.

371. Singer C, Marbaix E, Lemoine P, Courtoy P, Eeckhout Y: **Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts.** *Eur J Biochem* 1999, **259**:40-45.
372. Martelli M, Campana A, Bischof P: **Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro.** *J Reprod Fertil* 1993, **98**:67-76.
373. Hampton A, Salamonsen L: **Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation.** *J Endocrinol* 1994, **141**:R1-3.
374. Lockwood C, Krikun G, Hausknecht V, Papp C, Schatz F: **Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal.** *Endocrinology* 1998, **139**:4607-4613.
375. Salamonsen L, Kovacs G, Findlay J: **Current concepts of the mechanisms of menstruation.** *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 1999, **13**:161-179.
376. James T, Wagner R, White L, Zwolak R, Brinckerhoff C: **Induction of collagenase and stromelysin gene expression by mechanical injury in a vascular smooth muscle-derived cell line.** *J Cell Physiol* 1993, **157**:426-437.
377. Salamonsen L, Woolley D: **Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells.** *J Reprod Immunol* 1999, **44**:1-27.
378. Zhang J, Nie G, Jian W, Woolley D, Salamonsen L: **Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: A mechanism underlying menstruation.** *Biol Reprod* 1998, **59**:693-703.
379. Bruner-Tran K, Keller N, Osteen K: **Interleukin-1 alpha opposes suppression of human endometrial matrix metalloproteinases by progesterone in a model of experimental endometriosis.** In *Understanding and managing endometriosis: Advances in Research and Practice*. Edited by Lemay A, Maheux R. New York: Parthenon; 1999: 123-130
380. Garrido N, Albert C, Krüssel J, O'Connor J, Remohí J, Simón C, Pellicer A: **Expression, production, and secretion of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 by granulosa cells is comparable in women with and without endometriosis.** *Fertil Steril* 2001, **76**:568-575.
381. Wang H, Keiser J: **Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1.** *Circ Res* 1998, **83**:832-840.
382. Bruner K, Rodgers W, Gold L, Korc M, Hargrove J, Matrisian L, Osteen K: **Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:7362-7366.
383. Oosterlynck D, Meuleman C, Waer M, Koninckx P: **Transforming growth factor-beta activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis.** *Obstet Gynecol* 1994, **83**:287-292.
384. Page-McCaw A, Ewald A, Werb Z: **Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:221-233.
385. Matrisian L: **Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling.** *Trends Genet* 1990, **12**:121-125.
386. Osteen K, Yeaman G, Bruner-Tran K: **Matrix metalloproteinases and endometriosis.** *Semin Reprod Med* 2003, **21**:155-164.
387. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries S, Henney A: **Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human**

- stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996, **271**:13055-13060.
388. Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, Matsuda Y, Takai E, Iwai C, Kurogane H, et al: **Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction.** *Circulation* 1999, **99**:2717-2719.
389. Beyzade S, Zhang S, Wong Y, Day I, Eriksson P, Ye S: **Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 2003, **41**:2130-2137.
390. Yoon S, Tromp G, Vongpunsawad S, Ronkainen A, Juvonen T, Kuivaniemi H: **Genetic analysis of MMP3, MMP9, and PAI-1 in Finnish patients with abdominal aortic or intracranial aneurysms.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **265**:563-568.
391. Constantin A, Lauwers-Cancès V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A: **Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms: Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**:1754-1762.
392. Ghilardi G, Biondi M, Caputo M, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R: **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:3820-3823.
393. Samnegård A, Silveira A, Lundman P, Boquist S, Odeberg J, Hulthe J, McPheat W, Tornvall P, Bergstrand L, Ericsson C, et al: **Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3 -1612 5A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction.** *J Intern Med* 2005, **258**:411-419.
394. Shan K, Ying W, Jian-Hui Z, Wei G, Na W, Yan L: **The function of the SNP in the MMP1 and MMP3 promoter in susceptibility to endometriosis in China.** *Mol Hum Reprod* 2005, **11**:423-427.
395. Rutter J, Mitchell T, Buttice G, Meyers J, Gusella J, Ozelius L, Brinckerhoff C: **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription.** *Cancer Res* 1998, **58**:5321-5325.
396. Tower G, Coon C, Benbow U, Vincenti M, Brinckerhoff C: **Erk 1/2 differentially regulates the expression from the 1G/2G single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter in melanoma cells.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1586**:265-274.
397. Spurr N, Gough A, Gosden J, Rout D, Porteous D, van Heyningen V, Docherty A: **Restriction fragment length polymorphism analysis and assignment of the metalloproteinases stromelysin and collagenase to the long arm of chromosome 11.** *Genomics* 1988, **2**:119-127.
398. Ferrari M, Biondi M, Rossi G, Grijuela B, Gaita S, Perugino G, Viganò P: **Analysis of two polymorphisms in the promoter region of matrix metalloproteinase 1 and 3 genes in women with endometriosis.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006, **85**:212-217.
399. Borghese B, Chiche J, Vernerey D, Chenot C, Mir O, Bijaoui G, Bonaiti-Pellié C, Chapron C: **Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression.** *Hum Reprod* 2008, **23**:1207-1213.
400. Williamson R, Marston F, Angal S, Koklitis P, Panico M, Morris H, Carne A, Smith B, Harris T, Freedman R: **Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP).** *Biochem J* 1990, **268**:267-274.
401. Murphy G, Willenbrock F: **Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases.** *Methods Enzymol* 1995, **248**:496-510.
402. Douglas D, Shi Y, Sang Q: **Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family.** *J Protein Chem* 1997, **16**:237-255.

403. Pavloff N, Staskus P, Kishnani N, Hawkes S: **A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family.** *J Biol Chem* 1992, **267**:17321-17326.
404. Leco K, Khokha R, Pavloff N, Hawkes S, Edwards D: **Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues.** *J Biol Chem* 1994, **269**:9352-9360.
405. Hall M, Young D, Waters J, Rowan A, Chantry A, Edwards D, Clark I: **The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1.** *J Biol Chem* 2003, **278**:10304-10313.
406. Mattila L, Airola K, Ahonen M, Hietarinta M, Black C, Saarialho-Kere U, Kähäri V: **Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts.** *J Invest Dermatol* 1998, **110**:416-421.
407. Greene J, Wang M, Liu Y, Raymond L, Rosen C, Shi Y: **Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4.** *J Biol Chem* 1996, **271**:30375-30380.
408. Dollery C, McEwan J, Wang M, Sang Q, Liu Y, Shi Y: **TIMP-4 is regulated by vascular injury in rats.** *Circ Res* 1999, **84**:498-504.
409. Vaalamo M, Leivo T, Saarialho-Kere U: **Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing.** *Hum Pathol* 1999, **30**:795-802.
410. Clark I, Rowan A, Edwards D, Bech-Hansen T, Mann D, Bahr M, Cawston T: **Transcriptional activity of the human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) gene in fibroblasts involves elements in the promoter, exon 1 and intron 1.** *Biochem J* 1997, **324 (Pt 2)**:611-617.
411. Logan S, Garabedian M, Campbell C, Werb Z: **Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors.** *J Biol Chem* 1996, **271**:774-782.
412. Dean G, Young D, Edwards D, Clark I: **The human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 gene contains repressive elements within the promoter and intron 1.** *J Biol Chem* 2000, **275**:32664-32671.
413. Roberts D, Parmley T, Walker N, Horbelt D: **Ultrastructure of the microvasculature in the human endometrium throughout the normal menstrual cycle.** *Am J Obstet Gynecol* 1992, **166**:1393-1406.
414. Markee J: **Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey.** *Embriology* 1940, **177**:220-230.
415. Baird D, Cameron S, Critchley H, Drudy T, Howe A, Jones R, Lea R, Kelly R: **Prostaglandins and menstruation.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996, **70**:15-17.
416. Jones R, Kelly R, Critchley H: **Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1300-1306.
417. Campbell S, Cameron I: **The origins and physiology of menstruation.** In *Clinical Disorders of the Endometrium and Menstrual Cycle*. Edited by Cameron I, Fraser I, Smith S. Oxford: Oxford University Press; 1998: 13-30
418. Dong J, Dong H, Campana A, Bischof P: **Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation.** *Reproduction* 2002, **123**:621-631.

419. Rodgers W, Osteen K, Matrisian L, Navre M, Giudice L, Gorstein F: **Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle.** *Am J Obstet Gynecol* 1993, **168**:253-260.
420. Salamonsen L, Butt A, Hammond F, 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.
421. Rawdanowicz T, Hampton A, Nagase H, Woolley D, Salamonsen L: **Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha.** *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **79**:530-536.
422. Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot-Applanat M: **Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium.** *Biol Reprod* 1999, **61**:1070-1082.
423. Cano A, Morcillo N, Lopez F, Marquina P, Parrilla J, Abad L: **Cytoplasmic and nuclear estrogen binding capacity in the rat uterus during treatment with danazol and testosterone.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1986, **21**:245-252.
424. Salom J, Burguete M, Pérez-Asensio F, Torregrosa G, Alborch E: **Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2001, **21**:422-429.
425. Smith S: **Regulation of angiogenesis in the endometrium.** *Trends Endocrinol Metab* 2001, **12**:147-151.
426. Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmanen H, Larjava H: **Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing.** *Lab Invest* 1994, **70**:176-182.
427. Folkman J: **Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview.** *EXS* 1997, **79**:1-8.
428. Lamoreaux W, Fitzgerald M, Reiner A, Hasty K, Charles S: **Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro.** *Microvasc Res* 1998, **55**:29-42.
429. Määttä M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmanen H: **Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial adenocarcinomas is associated with low differentiation.** *Am J Clin Pathol* 2000, **114**:402-411.
430. Hiraoka N, Allen E, Apel I, Gyetko M, Weiss S: **Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins.** *Cell* 1998, **95**:365-377.
431. Raghow R: **The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis.** *FASEB J* 1994, **8**:823-831.
432. Werb Z, Chin J: **Extracellular matrix remodeling during morphogenesis.** *Ann N Y Acad Sci* 1998, **857**:110-118.
433. Newby A, Zaltsman A: **Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation.** *Cardiovasc Res* 1999, **41**:345-360.
434. Sternlicht M, Lochter A, Sympon C, Huey B, Rougier J, Gray J, Pinkel D, Bissell M, Werb Z: **The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis.** *Cell* 1999, **98**:137-146.
435. Cawston T: **Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases.** *Mol Med Today* 1998, **4**:130-137.

436. Batchelor W, Robinson R, Strauss B: **The extracellular matrix in balloon arterial injury: a novel target for restenosis prevention.** *Prog Cardiovasc Dis* 1998, **41**:35-49.
437. Greenwald R: **Treatment of destructive arthritic disorders with MMP inhibitors. Potential role of tetracyclines.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **732**:181-198.
438. Shapiro S: **Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**:602-608.
439. Orbe J, Fernandez L, Rodríguez J, Rábago G, Belzunce M, Monasterio A, Roncal C, Páramo J: **Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed.** *Atherosclerosis* 2003, **170**:269-276.
440. Wilson C, Heppner K, Labosky P, Hogan B, Matrisian L: **Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:1402-1407.
441. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S: **Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice.** *Cancer Res* 1998, **58**:1048-1051.
442. Kähäri V, Saarialho-Kere U: **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion.** *Ann Med* 1999, **31**:34-45.
443. Satoh T, Kobayashi K, Yamashita S, Kikuchi M, Sendai Y, Hoshi H: **Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo.** *Biol Reprod* 1994, **50**:835-844.
444. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K: **Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum.** *FEBS Lett* 1992, **298**:29-32.
445. Talhouk R, Bissell M, Werb Z: **Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution.** *J Cell Biol* 1992, **118**:1271-1282.
446. Khokha R: **Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1.** *J Natl Cancer Inst* 1994, **86**:299-304.
447. Imren S, Kohn D, Shimada H, Blavier L, DeClerck Y: **Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 retroviral-mediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion.** *Cancer Res* 1996, **56**:2891-2895.
448. Wang M, Liu Y, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen E, Shi Y: **Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4.** *Oncogene* 1997, **14**:2767-2774.
449. Ahonen M, Baker A, Kähäri V: **Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells.** *Cancer Res* 1998, **58**:2310-2315.
450. Polette M, Clavel C, Birembaut P, De Clerck Y: **Localization by in situ hybridization of mRNAs encoding stromelysin 3 and tissue inhibitors of metallo-proteinases TIMP-1 and TIMP-2 in human head and neck carcinomas.** *Pathol Res Pract* 1993, **189**:1052-1057.
451. Soloway P, Alexander C, Werb Z, Jaenisch R: **Targeted mutagenesis of Timp-1 reveals that lung tumor invasion is influenced by Timp-1 genotype of the tumor but not by that of the host.** *Oncogene* 1996, **13**:2307-2314.
452. Yoshiji H, Gomez D, Thorgeirsson U: **Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human breast cancer.** *Int J Cancer* 1996, **69**:131-134.

453. Patterson B, Sang Q: **Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9).** *J Biol Chem* 1997, **272**:28823-28825.
454. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler I: **Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma.** *Cell* 1997, **88**:801-810.
455. Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy P, Marbaix E: **Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions.** *Fertil Steril* 1997, **68**:246-251.
456. Wenzl R, Heinzl H: **Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants.** *Gynecol Obstet Invest* 1998, **45**:253-257.
457. Chung H, Lee J, Moon H, Hur S, Park M, Wen Y, Polan M: **Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium.** *Fertil Steril* 2002, **78**:787-795.
458. Tseng J, Ryan I, Milam T, Murai J, Schriock E, Landers D, Taylor R: **Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis.** *J Clin Endocrinol Metab* 1996, **81**:1118-1122.
459. Segars J: **Endometriosis and nuclear hormone receptors.** In *Endometrium and Endometriosis*. Edited by Diamond M, Osteen K. Malden: Blackwell Science; 1997: 321-332
460. Bruner-Tran K, Eisenberg E, Yeaman G, Anderson T, McBean 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.
461. Sharpe-Timms K: **Basic research in endometriosis.** *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997, **24**:269-290.
462. Bulun S, Zeitoun K, Takayama K, Noble L, Michael D, Simpson E, Johns A, Putman M, Sasano H: **Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis.** *Endocr Relat Cancer* 1999, **6**:293-301.
463. Saito T, Mizumoto H, Kuroki K, Fujii M, Mori S, Kudo R: **[Expression of MMP-3 and TIMP-1 in the endometriosis and the influence of danazol].** *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1995, **47**:495-496.
464. Sillem M, Prifti S, Koch A, Neher M, Jauckus J, Runnebaum B: **Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001, **95**:167-174.
465. Bellingard V, Hédon B, Capony F, Defrenne A, Rochefort H, Maudelonde T: **Identification of prometalloproteinase-3 as a major protein secreted by human endometrial fibroblasts and inhibited by coculture with trophoblast cells.** *Biol Reprod* 1996, **55**:604-612.
466. Sharpe-Timms K, Cox K: **Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis.** *Ann N Y Acad Sci* 2002, **955**:147-156; discussion 157-148, 396-406.
467. Cox K, Piva M, Sharpe-Timms K: **Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium.** *Biol Reprod* 2001, **65**:1297-1303.
468. Chung H, Wen Y, Chun S, Nezhat C, Woo B, Lake Polan M: **Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and**

- eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness.** *Fertil Steril* 2001, **75**:152-159.
469. Groothuis P, Koks C, de Goeij A, Dunselman G, Arends J, Evers J: **Adhesion of human endometrial fragments to peritoneum in vitro.** *Fertil Steril* 1999, **71**:1119-1124.
470. Oral E, Olive D, Arici A: **The peritoneal environment in endometriosis.** *Hum Reprod Update* 1996, **2**:385-398.
471. Maeda N, Izumiya C, Oguri H, Kusume T, Yamamoto Y, Fukaya T: **Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis.** *Fertil Steril* 2002, **77**:679-683.
472. Senturk L, Arici A: **Immunology of endometriosis.** *J Reprod Immunol* 1999, **43**:67-83.
473. Mahnke J, Dawood M, Huang J: **Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis.** *Fertil Steril* 2000, **73**:166-170.
474. Richter O, Dorn C, Rösing B, Flaskamp C, Ulrich U: **Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis.** *Arch Gynecol Obstet* 2005, **271**:143-147.
475. Dmowski W, Gebel H, Braun D: **The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis.** *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1994, **159**:7-14.
476. Szamatowicz J, Ludański P, Tomaszewska I: **Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis.** *Hum Reprod* 2002, **17**:284-288.
477. Sharpe-Timms K, Penney L, Zimmer R, Wright J, Zhang Y, Surewicz K: **Partial purification and amino acid sequence analysis of endometriosis protein-II (ENDO-II) reveals homology with tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1).** *J Clin Endocrinol Metab* 1995, **80**:3784-3787.
478. Sharpe-Timms K, Keisler L, McIntush E, Keisler D: **Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations are attenuated in peritoneal fluid and sera of women with endometriosis and restored in sera by gonadotropin-releasing hormone agonist therapy.** *Fertil Steril* 1998, **69**:1128-1134.
479. Healy D, Rogers P, Hii L, Wingfield M: **Angiogenesis: a new theory for endometriosis.** *Hum Reprod Update* 1998, **4**:736-740.
480. Taylor R, Lebovic D, Mueller M: **Angiogenic factors in endometriosis.** *Ann N Y Acad Sci* 2002, **955**:89-100; discussion 118, 396-406.
481. Hyder S, Stancel G: **Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins.** *Mol Endocrinol* 1999, **13**:806-811.
482. Folkman J, Shing Y: **Angiogenesis.** *J Biol Chem* 1992, **267**:10931-10934.
483. Gordon J, Shifren J, Foulk R, Taylor R, Jaffe R: **Angiogenesis in the human female reproductive tract.** *Obstet Gynecol Surv* 1995, **50**:688-697.
484. Ferrara N: **Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1999, **237**:1-30.
485. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber H, Nguyen T, Peers D, Chisholm V, Hillan K, Schwall R: **Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis.** *Nat Med* 1998, **4**:336-340.
486. Ortega S, Ittmann M, Tsang S, Ehrlich M, Basilico C: **Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:5672-5677.
487. Nissen N, Polverini P, Koch A, Volin M, Gamelli R, DiPietro L: **Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing.** *Am J Pathol* 1998, **152**:1445-1452.

488. Swift M, Kleinman H, DiPietro L: **Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice.** *Lab Invest* 1999, **79**:1479-1487.
489. Klagsbrun M, Moses M: **Molecular angiogenesis.** *Chem Biol* 1999, **6**:R217-224.
490. Moore B, Keane M, Addison C, Arenberg D, Strieter R: **CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family.** *J Investig Med* 1998, **46**:113-120.
491. Brown N, Bicknell R: **Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis.** *Biochem J* 1998, **334 (Pt 1)**:1-8.
492. Chiarugi V, Magnelli L, Gallo O: **Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis (review).** *Int J Mol Med* 1998, **2**:715-719.
493. Falcone D, McCaffrey T, Haimovitz-Friedman A, Garcia M: **Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor.** *J Cell Physiol* 1993, **155**:595-605.
494. Pintavorn P, Ballermann B: **TGF-beta and the endothelium during immune injury.** *Kidney Int* 1997, **51**:1401-1412.
495. Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber H, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N, Bussolino F: **Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**:22128-22135.
496. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M: **Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:4015-4023.
497. Senger D, Galli S, Dvorak A, Perruzzi C, Harvey V, Dvorak H: **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.** *Science* 1983, **219**:983-985.
498. Ferrara N, Henzel W: **Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1989, **161**:851-858.
499. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J: **The biology of VEGF and its receptors.** *Nat Med* 2003, **9**:669-676.
500. McDonald N, Hendrickson W: **A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif.** *Cell* 1993, **73**:421-424.
501. Iyer S, Leonidas D, Swaminathan G, Maglione D, Battisti M, Tucci M, Persico M, Acharya K: **The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution.** *J Biol Chem* 2001, **276**:12153-12161.
502. Mattei M, Borg J, Rosnet O, Marmé D, Birnbaum D: **Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively.** *Genomics* 1996, **32**:168-169.
503. Wei M, Popescu N, Lerman M, Merrill M, Zimonjic D: **Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12.** *Hum Genet* 1996, **97**:794-797.
504. Leung D, Cachianes G, Kuang W, Goeddel D, Ferrara N: **Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.** *Science* 1989, **246**:1306-1309.
505. Houck K, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung D: **The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.** *Mol Endocrinol* 1991, **5**:1806-1814.

506. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J: **The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.** *J Biol Chem* 1991, **266**:11947-11954.
507. Jingjing L, Xue Y, Agarwal N, Roque R: **Human Müller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, **40**:752-759.
508. Whittle C, Gillespie K, Harrison R, Mathieson P, Harper S: **Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant.** *Clin Sci (Lond)* 1999, **97**:303-312.
509. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, Neufeld G: **VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix.** *J Biol Chem* 1997, **272**:7151-7158.
510. Ferrara N, Davis-Smyth T: **The biology of vascular endothelial growth factor.** *Endocr Rev* 1997, **18**:4-25.
511. Houck K, Leung D, Rowland A, Winer J, Ferrara N: **Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms.** *J Biol Chem* 1992, **267**:26031-26037.
512. Plouët J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, Bayard F: **Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect.** *J Biol Chem* 1997, **272**:13390-13396.
513. Veikkola T, Alitalo K: **VEGFs, receptors and angiogenesis.** *Semin Cancer Biol* 1999, **9**:211-220.
514. Pepper M, Ferrara N, Orci L, Montesano R: **Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **189**:824-831.
515. Mandriota S, Seghezzi G, Vassalli J, Ferrara N, Wasi S, Mazzieri R, Mignatti P, Pepper M: **Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 1995, **270**:9709-9716.
516. Dvorak H, Brown L, Detmar M, Dvorak A: **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.** *Am J Pathol* 1995, **146**:1029-1039.
517. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K, Powell-Braxton L, Hillan K, Moore M: **Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.** *Nature* 1996, **380**:439-442.
518. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T, Gertsenstein M, Wu X, Breitman M, Schuh A: **Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.** *Nature* 1995, **376**:62-66.
519. Fong G, Zhang L, Bryce D, Peng J: **Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice.** *Development* 1999, **126**:3015-3025.
520. Akagi Y, Liu W, Xie K, Zebrowski B, Shaheen R, Ellis L: **Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1beta.** *Br J Cancer* 1999, **80**:1506-1511.
521. Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, et al: **Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia.** *Oncogene* 1997, **14**:2475-2483.

522. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou X, Foster D, Brugge J, Sukhatme V: **Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation.** *Nature* 1995, **375**:577-581.
523. Ikeda E, Achen M, Breier G, Risau W: **Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells.** *J Biol Chem* 1995, **270**:19761-19766.
524. Liekens S, De Clercq E, Neyts J: **Angiogenesis: regulators and clinical applications.** *Biochem Pharmacol* 2001, **61**:253-270.
525. Helmlinger G, Endo M, Ferrara N, Hlatky L, Jain R: **Formation of endothelial cell networks.** *Nature* 2000, **405**:139-141.
526. Richard D, Berra E, Pouyssegur J: **Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **266**:718-722.
527. Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V: **Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia.** *Circulation* 1996, **94**:1647-1654.
528. Mueller M, Vigne J, Minchenko A, Lebovic D, Leitman D, Taylor R: **Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:10972-10977.
529. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico M: **Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:9267-9271.
530. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P: **Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders.** *J Thromb Haemost* 2003, **1**:1356-1370.
531. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, et al: **Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.** *Nat Med* 2001, **7**:575-583.
532. Park J, Chen H, Winer J, Houck K, Ferrara N: **Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR.** *J Biol Chem* 1994, **269**:25646-25654.
533. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M: **Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor.** *Cell Growth Differ* 1996, **7**:213-221.
534. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller N, Risau W, Ullrich A: **High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.** *Cell* 1993, **72**:835-846.
535. Barleon B, Hauser S, Schöllmann C, Weindel K, Marmé D, Yayon A, Weich H: **Differential expression of the two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells.** *J Cell Biochem* 1994, **54**:56-66.
536. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath E: **Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells.** *J Cell Physiol* 2001, **188**:359-368.
537. Amemiya T, Sasamura H, Mifune M, Kitamura Y, Hirahashi J, Hayashi M, Saruta T: **Vascular endothelial growth factor activates MAP kinase and enhances collagen synthesis in human mesangial cells.** *Kidney Int* 1999, **56**:2055-2063.
538. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich H, Mantovani A, Marmé D: **Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1.** *Blood* 1996, **87**:3336-3343.

539. Ahmed A, Dunk C, Kniss D, Wilkes M: **Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells.** *Lab Invest* 1997, **76**:779-791.
540. Gerber H, Vu T, Ryan A, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: **VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.** *Nat Med* 1999, **5**:623-628.
541. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, et al: **Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1.** *Nat Med* 2003, **9**:936-943.
542. Kendall R, Thomas K: **Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:10705-10709.
543. Watson C, Webb N, Bottomley M, Brenchley P: **Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production.** *Cytokine* 2000, **12**:1232-1235.
544. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E: **A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels.** *J Vasc Res* 2000, **37**:443-448.
545. Lin C, Wu H, Tsai F, Chen H, Chen W: **Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer.** *Urology* 2003, **62**:374-377.
546. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher T, Paulweber B, Haas J, Samonigg H: **A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk.** *Int J Cancer* 2003, **106**:468-471.
547. Lee S, Lee S, Jeon H, Park S, Jang J, Lee G, Son J, Kim C, Lee W, Kam S, et al: **Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and risk of primary lung cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**:571-575.
548. Hsieh Y, Chang C, Tsai F, Yeh L, Lin C, Peng C: **T allele for VEGF gene-460 polymorphism at the 5'-untranslated region: association with a higher susceptibility to endometriosis.** *J Reprod Med* 2004, **49**:468-472.
549. Gentilini D, Somigliana E, Vignani P, Vignali M, Busacca M, Di Blasio A: **The vascular endothelial growth factor +405G>C polymorphism in endometriosis.** *Hum Reprod* 2008, **23**:211-215.
550. Bhanoori M, Arvind Babu K, Pavankumar Reddy N, Lakshmi Rao K, Zondervan K, Deenadayal M, Kennedy S, Shivaji S: **The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G>C 5'-untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study.** *Hum Reprod* 2005, **20**:1844-1849.
551. Kim S, Choi Y, Choung S, Jun J, Kim J, Moon S: **Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis.** *Hum Reprod* 2005, **20**:2904-2908.
552. Ikuhashi Y, Yoshida S, Kennedy S, Zondervan K, Takemura N, Deguchi M, Ohara N, Maruo T: **Vascular endothelial growth factor +936 C/T polymorphism is associated with an increased risk of endometriosis in a Japanese population.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007, **86**:1352-1358.
553. Kim J, Kim J, Jee B, Suh C, Kim S, Choi Y: **Association between endometriosis and polymorphisms in endostatin and vascular endothelial growth factor and their serum levels in Korean women.** *Fertil Steril* 2008, **89**:243-245.

554. Qabar A, Derick L, Lawler J, Dixit V: **Thrombospondin 3 is a pentameric molecule held together by interchain disulfide linkage involving two cysteine residues.** *J Biol Chem* 1995, **270**:12725-12729.
555. Armstrong L, Bornstein P: **Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis.** *Matrix Biol* 2003, **22**:63-71.
556. Iruela-Arispe M, Porter P, Bornstein P, Sage E: **Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium.** *J Clin Invest* 1996, **97**:403-412.
557. Bornstein P: **Thrombospondins function as regulators of angiogenesis.** *J Cell Commun Signal* 2009, **3**:189-200.
558. Crawford S, Stellmach V, Murphy-Ullrich J, Ribeiro S, Lawler J, Hynes R, Boivin G, Bouck N: **Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo.** *Cell* 1998, **93**:1159-1170.
559. Streit M, Velasco P, Riccardi L, Spencer L, Brown L, Janes L, Lange-Asschenfeldt B, Yano K, Hawighorst T, Iruela-Arispe L, Detmar M: **Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice.** *EMBO J* 2000, **19**:3272-3282.
560. Kyriakides T, Zhu Y, Smith L, Bain S, Yang Z, Lin M, Danielson K, Iozzo R, LaMarca M, McKinney C, et al: **Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis.** *J Cell Biol* 1998, **140**:419-430.
561. Kyriakides T, Tam J, Bornstein P: **Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene.** *J Invest Dermatol* 1999, **113**:782-787.
562. Kyriakides T, Leach K, Hoffman A, Ratner B, Bornstein P: **Mice that lack the angiogenesis inhibitor, thrombospondin 2, mount an altered foreign body reaction characterized by increased vascularity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4449-4454.
563. Agah A, Kyriakides T, Lawler J, Bornstein P: **The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice.** *Am J Pathol* 2002, **161**:831-839.
564. Hahn-Dantona E, Ruiz J, Bornstein P, Strickland D: **The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism.** *J Biol Chem* 2001, **276**:15498-15503.
565. Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J: **Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1).** *J Cell Physiol* 2007, **210**:807-818.
566. Rodriguez-Manzaneque J, Lane T, Ortega M, Hynes R, Lawler J, Iruela-Arispe M: **Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:12485-12490.
567. Ribeiro S, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich J: **The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta.** *J Biol Chem* 1999, **274**:13586-13593.
568. Dawson D, Pearce S, Zhong R, Silverstein R, Frazier W, Bouck N: **CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells.** *J Cell Biol* 1997, **138**:707-717.

569. Jiménez B, Volpert O, Crawford S, Febbraio M, Silverstein R, Bouck N: **Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1.** *Nat Med* 2000, **6**:41-48.
570. Chandrasekaran L, He C, Al-Barazi H, Krutzsch H, Iruela-Arispe M, Roberts D: **Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:2885-2900.
571. Margosio B, Rusnati M, Bonezzi K, Cordes B, Annis D, Urbinati C, Giavazzi R, Presta M, Ribatti D, Mosher D, Taraboletti G: **Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**:700-709.
572. Iruela-Arispe M, Lombardo M, Krutzsch H, Lawler J, Roberts D: **Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type I repeats.** *Circulation* 1999, **100**:1423-1431.
573. Margosio B, Marchetti D, Vergani V, Giavazzi R, Rusnati M, Presta M, Taraboletti G: **Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2.** *Blood* 2003, **102**:4399-4406.
574. Gupta K, Gupta P, Wild R, Ramakrishnan S, Hebbel R: **Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis.** *Angiogenesis* 1999, **3**:147-158.
575. Lamszus K, Joseph A, Jin L, Yao Y, Chowdhury S, Fuchs A, Polverini P, Goldberg I, Rosen E: **Scatter factor binds to thrombospondin and other extracellular matrix components.** *Am J Pathol* 1996, **149**:805-819.
576. Febbraio M, Hajjar D, Silverstein R: **CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism.** *J Clin Invest* 2001, **108**:785-791.
577. Simantov R, Febbraio M, Crombie R, Asch A, Nachman R, Silverstein R: **Histidine-rich glycoprotein inhibits the antiangiogenic effect of thrombospondin-1.** *J Clin Invest* 2001, **107**:45-52.
578. Folkman J: **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.** *Nat Med* 1995, **1**:27-31.
579. Klein M, Vignaud J, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F, Leclère J, Duprez A, Weryha G: **Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**:656-658.
580. Levine R, Maynard S, Qian C, Lim K, England L, Yu K, Schisterman E, Thadhani R, Sachs B, Epstein F, et al: **Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia.** *N Engl J Med* 2004, **350**:672-683.
581. Breier G, Damert A, Plate K, Risau W: **Angiogenesis in embryos and ischemic diseases.** *Thromb Haemost* 1997, **78**:678-683.
582. Klauber N, Rohan R, Flynn E, D'Amato R: **Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470.** *Nature Med* 1987, **3**:443-446.
583. Shifren J, Tseng J, Zaloudek C, Ryan I, Meng Y, Ferrara N, Jaffe R, Taylor R: **Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis.** *J Clin Endocrinol Metab* 1996, **81**:3112-3118.
584. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis.** *Hum Reprod* 1998, **13**:1686-1690.

585. Tan X, Lang J, Liu D, Shen K, Leng J, Zhu L: **Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis.** *Fertil Steril* 2002, **78**:148-153.
586. Fasciani A, D'Ambrogio G, Bocci G, Monti M, Genazzani A, Artini P: **High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata.** *Mol Hum Reprod* 2000, **6**:50-54.
587. Takehara M, Ueda M, Yamashita Y, Terai Y, Hung Y, Ueki M: **Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis.** *Hum Pathol* 2004, **35**:1369-1375.
588. Li X, Charnock-Jones D, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen J, Gardner L, King A, et al: **Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**:1823-1834.
589. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M, Katano K, Suzumori K: **Women with endometriosis have increased levels of placental growth factor in the peritoneal fluid compared with women with cystadenomas.** *Hum Reprod* 2003, **18**:2595-2598.
590. Kawano Y, Nakamura S, Nasu K, Fukuda J, Narahara H, Miyakawa I: **Expression and regulation of thrombospondin-1 by human endometrial stromal cells.** *Fertil Steril* 2005, **83**:1056-1059.
591. Pepper M: **Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, **21**:1104-1117.
592. Bruse C, Radu D, Bergqvist A: **In situ localization of mRNA for the fibrinolytic factors uPA, PAI-1 and uPAR in endometriotic and endometrial tissue.** *Mol Hum Reprod* 2004, **10**:159-166.
593. Lembessis P, Milingos S, Michalas S, Milingos D, Creatas G, Sourla A, Koutsilieris M: **Urokinase-type plasminogen activator and insulin-like growth factor-binding protein 3 mRNA expression in endometriotic lesions and eutopic endometrium: implications for the pathophysiology of endometriosis.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **997**:223-228.
594. Mignatti P, Rifkin D: **Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis.** *Enzyme Protein* 1996, **49**:117-137.
595. Blasi F: **uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?** *Immunol Today* 1997, **18**:415-417.
596. Eeckhout Y, Vaes G: **Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation.** *Biochem J* 1977, **166**:21-31.
597. Baramova E, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell H, Weidle U, Noel A, Foidart J: **Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation.** *FEBS Lett* 1997, **405**:157-162.
598. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knäuper V, Atkinson S, Gavrilovic J: **Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation.** *APMIS* 1999, **107**:38-44.
599. Lijnen H: **Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity.** *Biochemistry (Mosc)* 2002, **67**:92-98.
600. Mignatti P, Rifkin D: **Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion.** *Physiol Rev* 1993, **73**:161-195.
601. Lucas R, Holmgren L, Garcia I, Jimenez B, Mandriota S, Borlat F, Sim B, Wu Z, Grau G, Shing Y, et al: **Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells.** *Blood* 1998, **92**:4730-4741.
602. Bellon G, Martiny L, Robinet A: **Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, **49**:203-220.

603. Marcotte P, Kozan I, Dorwin S, Ryan J: **The matrix metalloproteinase pump-1 catalyzes formation of low molecular weight (pro)urokinase in cultures of normal human kidney cells.** *J Biol Chem* 1992, **267**:13803-13806.
604. Ugwu F, Van Hoef B, Bini A, Collen D, Lijnen H: **Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3).** *Biochemistry* 1998, **37**:7231-7236.
605. Carmeliet P, Collen D: **Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system.** *Thromb Res* 1998, **91**:255-285.
606. Lijnen H: **Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling.** *Thromb Haemost* 2001, **86**:324-333.
607. Lee S, Jilani S, Nikolova G, Carpizo D, Iruela-Arispe M: **Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors.** *J Cell Biol* 2005, **169**:681-691.
608. Chen T, Luque A, Lee S, Anderson S, Segura T, Iruela-Arispe M: **Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells.** *J Cell Biol* 2010, **188**:595-609.
609. Schüklenk U: **Helsinki Declaration: proposed revision.** *Bull Med Ethics* 1999, No. **149**:2.
610. **Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996.** *Fertil Steril* 1997, **67**:817-821.
611. Bouckaert P, Evers J, Doesburg W, Schellekens L, Rolland R: **Patterns of changes in glycoproteins, polypeptides, and steroids in the peritoneal fluid of women during the periovulatory phase of the menstrual cycle.** *J Clin Endocrinol Metab* 1986, **62**:293-299.
612. Sambrook J, Russell D: **Extraction, Purification and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells.** In *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001: 7-1-94
613. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N: **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science* 1985, **230**:1350-1354.
614. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, **51 Pt 1**:263-273.
615. Mullis K, Faloona F: **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** *Methods Enzymol* 1987, **155**:335-350.
616. Izquierdo M: **La reacción en cadena de la polimerasa.** In *Ingeniería genética y transferencia génica*. Madrid: Ed pirámide S.A.; 1999: 85-99
617. Higuchi R, Dollinger G, Walsh P, Griffith R: **Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.** *Biotechnology (N Y)* 1992, **10**:413-417.
618. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y)* 1993, **11**:1026-1030.
619. Wittwer C, Fillmore G, Hillyard D: **Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air.** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**:4353-4357.
620. Wittwer C, Fillmore G, Garling D: **Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples.** *Anal Biochem* 1990, **186**:328-331.

621. Lekanne Deprez R, Fijnvandraat A, Ruijter J, Moorman A: **Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions.** *Anal Biochem* 2002, **307**:63-69.
622. Bustin S: **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol* 2000, **25**:169-193.
623. Rasmussen R: **Quantification on the LightCycler.** In *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Edited by Witter CT MS, Nakagawara K, eds. Heidelberg: Springer Verlag; 2001: 21-34
624. Enger O: **Use of the fluorescent dye PicoGreen for quantification of PCR products after agarose gel electrophoresis.** *Biotechniques* 1996, **21**:372-374.
625. Nie G, Wang J, Li Y, Salamonsen L: **Construction and application of a multispecific competitor to quantify mRNA of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in small human biopsies.** *J Biochem Biophys Methods* 1999, **40**:81-99.
626. Zhou H, Nothnick W: **The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis.** *Front Biosci* 2005, **10**:569-575.
627. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant J, Pignon M, Noel A, Schaaps J, Cabrol D, Frankenne F, Foidart J: **Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**:5555-5563.
628. Jover R, Bort R, Gómez-Lechón M, Castell J: **Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells.** *FEBS Lett* 1998, **431**:227-230.
629. Bouchet-Bernet C, Spyrtos F, Andrieu C, Deytieux S, Bécette V, Oglobine J: **Influence of the extraction procedure on plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) and urokinase receptor (uPAR) assays in breast cancer tissues.** *Breast Cancer Res Treat* 1996, **41**:141-146.
630. Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**:76-85.
631. Engvall E, Perlmann P: **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.** *Immunochemistry* 1971, **8**:871-874.
632. Hornbeck P, Winston S, Fuller S: **Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.** In *Current protocols in molecular biology*. Edited by Ausubel FM. New York: Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley; 1991: 11.12.11–22.
633. Jordan W: **Antigen Measurements Using ELISA.** In *The protein protocols handbook*. 2nd edition. Edited by Walker JM. Totowa, N.J.: Humana Press; 2002: 1083-1088
634. Miller S, Dykes D, Polesky H: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**:1215.
635. Dunleavy L, Beyzade S, Ye S: **Rapid genotype analysis of the stromelysin gene 5A/6A polymorphism.** *Atherosclerosis* 2000, **151**:587-589.
636. Ryan I, Schriock E, Taylor R: **Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro.** *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **78**:642-649.
637. Barrett J, Fry B, Maller J, Daly M: **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005, **21**:263-265.
638. Spuijbroek M, Dunselman G, Menheere P, Evers J: **Early endometriosis invades the extracellular matrix.** *Fertil Steril* 1992, **58**:929-933.
639. Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine J, Donnez J: **Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis.** *Fertil Steril* 1993, **59**:681-684.

640. Gottschalk C, Malberg K, Arndt M, Schmitt J, Roessner A, Schultze D, Kleinstein J, Ansoorge S: **Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis.** *Adv Exp Med Biol* 2000, **477**:483-486.
641. Print C, Valtola R, Evans A, Lessan K, Malik S, Smith S: **Soluble factors from human endometrium promote angiogenesis and regulate the endothelial cell transcriptome.** *Hum Reprod* 2004, **19**:2356-2366.
642. Ugwu F, Lemmens G, Collen D, Lijnen H: **Modulation of cell-associated plasminogen activation by stromelysin-1 (MMP-3).** *Thromb Haemost* 1999, **82**:1127-1131.
643. Wu Y, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Jailwala P, Wang Y, Wang X, Ghosh S, Guo S: **Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium.** *Endocrinology* 2006, **147**:232-246.
644. Osteen K, Bruner K, Sharpe-Timms K: **Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis.** *Semin Reprod Endocrinol* 1996, **14**:247-255.
645. Koninckx P, Kennedy S, Barlow D: **Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid.** *Hum Reprod Update* 1998, **4**:741-751.
646. Na Y, Yang S, Baek D, Lee D, Kim K, Choi Y, Oh S, Hong Y, Kwak J, Lee K: **Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of vascular endothelial growth factor by neutrophils and monocytes.** *Hum Reprod* 2006, **21**:1846-1855.
647. Hull M, Charnock-Jones D, Chan C, Bruner-Tran K, Osteen K, Tom B, Fan T, Smith S: **Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**:2889-2899.
648. Nap A, Griffioen A, Dunselman G, Bouma-Ter Steege J, Thijssen V, Evers J, Groothuis P: **Antiangiogenesis therapy for endometriosis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**:1089-1095.
649. Van Langendonck A, Donnez J, Defrère S, Dunselman G, Groothuis P: **Antiangiogenic and vascular-disrupting agents in endometriosis: pitfalls and promises.** *Mol Hum Reprod* 2008, **14**:259-268.
650. Bedaiwy M, Falcone T, Mascha E, Casper R: **Genetic polymorphism in the fibrinolytic system and endometriosis.** *Obstet Gynecol* 2006, **108**:162-168.
651. Ramón L, Gilabert-Estellés J, Cosín R, Gilabert J, España F, Castelló R, Chirivella M, Romeu A, Estellés A: **Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism and endometriosis. Influence of PAI-1 polymorphism on PAI-1 antigen and mRNA expression.** *Thromb Res* 2008, **122**:854-860.
652. Gentilini D, Vigano P, Castaldi D, Mari D, Busacca M, Vercellini P, Somigliana E, di Blasio A: **Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and susceptibility to endometriosis in the Italian population.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009.
653. Seguí R, Estellés A, Mira Y, España F, Villa P, Falcó C, Vayá A, Grancha S, Ferrando F, Aznar J: **PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects.** *Br J Haematol* 2000, **111**:122-128.
654. Folsom A, Cushman M, Heckbert S, Rosamond W, Aleksic N: **Prospective study of fibrinolytic markers and venous thromboembolism.** *J Clin Epidemiol* 2003, **56**:598-603.
655. Mattes D, Weger M, Renner W, Cichocki L, Haas A: **Role of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion and plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphisms in retinal vein occlusion.** *J Thromb Haemost* 2005, **3**:2583-2584.
656. Wiklund P, Nilsson L, Ardnor S, Eriksson P, Johansson L, Stegmayr B, Hamsten A, Holmberg D, Asplund K: **Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism**

- and risk of stroke: replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts.** *Stroke* 2005, **36**:1661-1665.
657. Hellebrekers B, Emeis J, Kooistra T, Trimpos J, Moore N, Zwinderman K, Trimpos-Kemper T: **A role for the fibrinolytic system in postsurgical adhesion formation.** *Fertil Steril* 2005, **83**:122-129.
658. Ng M, Wang Y, So W, Cheng S, Visvikis S, Zee R, Fernandez-Cruz A, Lindpaintner K, Chan J: **Ethnic differences in the linkage disequilibrium and distribution of single-nucleotide polymorphisms in 35 candidate genes for cardiovascular diseases.** *Genomics* 2004, **83**:559-565.
659. Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón L, España F, Gilabert J, Romeu A, Estellés A: **Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression.** *Fertil Steril* 2009, **92**:1214-1220.
660. Zhao Z, Nyholt D, Thomas S, Treloar S, Montgomery G: **Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis.** *Mol Hum Reprod* 2008, **14**:531-538.
661. Liu Q, Li Y, Zhao J, Sun D, Duan Y, Wang N, Zhou R, Kang S: **Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women.** *Hum Reprod* 2009, **24**:2660-2666.
662. Altinkaya S, Ugur M, Ceylaner G, Ozat M, Gungor T, Ceylaner S: **Vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism is highly associated with an increased risk of endometriosis in Turkish women.** *Arch Gynecol Obstet* 2009.
663. Attar R, Agachan B, Kuran S, Toptas B, Eraltan I, Attar E, Isbir T: **Genetic variants of vascular endothelial growth factor and risk for the development of endometriosis.** *In Vivo* 2010, **24**:297-301.
664. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S: **A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes.** *Diabetes* 2002, **51**:1635-1639.
665. Stevens A, Soden J, Brenchley P, Ralph S, Ray D: **Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter.** *Cancer Res* 2003, **63**:812-816.
666. Ioannidis J: **Genetic associations: false or true?** *Trends Mol Med* 2003, **9**:135-138.
667. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones D, Smith S: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis.** *Hum Reprod* 1996, **11**:220-223.
668. Lebovic D, Bentzien F, Chao V, Garrett E, Meng Y, Taylor R: **Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta.** *Mol Hum Reprod* 2000, **6**:269-275.
669. Arroyo A, Iruela-Arispe M: **Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response.** *Cardiovasc Res* 2010, **86**:226-235.
670. Ramón L, Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, Gilabert J, España F, Chirivella M, Estellés A: **microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors.** *Hum Reprod* 2011, **in press**.
671. Zorio E, Ramón L, Medina P, Fernández E, Cano Ó, Navarro J, Salvador A, España F, Estellés A: **Novedades en hemostasia e hipercoagulabilidad: ARN en hemostasia, biología vascular y cardiopatías.** *haematologica/edición española* 2009, **94 (Extra 1)**:244-251.

**8.- APÉNDICE: TRABAJOS
PUBLICADOS EN LOS QUE HA
INTERVENIDO EL DOCTORANDO**

“El primer pecado de la humanidad fue la fe, la primera virtud la duda”.

Carl Sagan

mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT–PCR assay

L.Ramón¹, J.Gilabert-Estellés², R.Castelló¹, J.Gilabert³, F.España¹, A.Romeu¹, M.Chirivella⁴, J.Aznar⁵ and A.Estellés^{1,6}

¹Research Center, ²Maternal Hospital, ⁴Anatomopathology and ⁵Clinical Pathology Departments, Hospital Universitario La Fe and ³Gynecology Service, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain

⁶To whom correspondence should be addressed at: Hospital Universitario 'La Fe', Centro de Investigación, Avenida Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. E-mail: estelles_amp@gva.es

L.Ramón and J.Gilabert-Estellés have contributed similarly in the present article.

BACKGROUND: The plasminogen activator (PA) and matrix metalloproteinase (MMP) systems are implicated in the establishment of endometriosis. The mechanisms by which these systems are involved in the pathogenesis of this disease are not well defined and controversial results have been published. The aim of this study was to analyse mRNA and protein levels of several components of the PA and MMP systems in endometriotic tissue and endometrium from women with and without endometriosis. **METHODS and RESULTS:** Real-time quantitative RT–PCR assays were developed to quantify mRNA levels of these components in 57 women with endometriosis and 32 controls. Endometrium of women with endometriosis showed higher mRNA and antigenic levels of urokinase type-PA (uPA) and MMP-3 than endometrium from controls. In these patients, ovarian endometriotic tissue had higher mRNA and antigenic levels of PA inhibitor type 1 (PAI-1) and MMP inhibitor type 1 (TIMP-1) than endometrium. **CONCLUSIONS:** The increase in mRNA and protein levels of uPA and MMP-3 observed in endometrium of women with endometriosis may facilitate the attachment of endometrial tissue to the peritoneum and ovarian surface, as well as the invasion of the extracellular matrix. This process would lead to the formation of early endometriotic lesions. Once the ovarian endometriotic cyst is developed, PAI-1 and TIMP-1 would increase which could explain the frequent clinical finding of an endometrioma without invasion of the adjacent ovarian tissue.

Key words: endometriosis/inhibitors/matrix metalloproteinase/plasminogen activators/quantitative RT–PCR

Introduction

Endometriosis is one of the most frequent benign gynaecological diseases that affects women of reproductive age with pelvic pain or infertility (Martinez-Roman *et al.*, 1997; Giudice *et al.*, 1998; Pellicer *et al.*, 2001). Little is known about the pathogenesis of endometriosis. However, it is thought that retrograde menstruation may transport endometrial tissue to ectopic locations. By degrading extracellular matrix, the ectopic endometrium may be able to implant and invade peritoneum and the surrounding structures (Spuijbroek *et al.*, 1992; Kobayashi, 2000). The plasminogen activator (PA) and matrix metalloproteinase (MMP) systems may be involved in this process.

The PA system includes a broad spectrum of proteolytic enzymes with physiological and pathophysiological functions such as fibrinolysis, tissue remodelling and tumor invasion, and may also be implicated in the reproductive process

(Loskutoff, 1991; Estellés *et al.*, 1994; Gilabert *et al.*, 1995a and 1995b; Andreasen *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 2000; Castelló *et al.*, 2002). Plasminogen is activated to plasmin by two types of activators, urokinase-type PA (uPA) and tissue-type PA (tPA). Whereas tPA is involved in the lysis of fibrin clots, uPA is mainly implicated in cellular proteolysis. The activity of the PAs is regulated by specific PA inhibitors (PAIs). The principal PAIs are PAI-1, also named endothelial cell PAI (Loskutoff, 1991), PAI-2, or placental-type PAI (Kruithof *et al.*, 1995; Grancha *et al.*, 1996) and PAI-3, which is identical to protein C inhibitor (Heeb *et al.*, 1987). In addition, PAI-1 plays an important role in signal transduction, cell adherence and cell migration (Harbeck *et al.*, 2001).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of enzymes involved in extracellular matrix remodelling (Matrisian, 1992). These proteases have been implicated in

PLASMINOGEN ACTIVATORS AND PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITORS IN ENDOMETRIOSIS

Juan Gilabert-Estelles¹, Remedios Castello², Juan Gilabert³, Luis Andres Ramon², Francisco Espana², Alberto Romeu¹, Amparo Estelles²

¹Department of Gynecology (Human Reproduction), ²Research Center, Hospital Universitario La Fe, and ³Department of Gynecology, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. General aspects of the fibrinolytic system
 - 3.1. Plasminogen and plasmin
 - 3.2. Plasminogen activators
 - 3.2.1. Tissue-type plasminogen activator (tPA)
 - 3.2.2. Urokinase-type plasminogen activator (uPA)
 - 3.3. Plasminogen activator inhibitors
 - 3.3.1. Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)
 - 3.3.2. Plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2)
 - 3.3.3. Plasminogen activator inhibitor type 3 (PAI-3)
 - 3.4. Relationship between plasminogen activator and metalloproteinase systems.
4. The role of fibrinolytic system in endometriosis
 - 4.1. Plasminogen activator system in normal endometrium
 - 4.2. Plasminogen activator system in endometriosis
 - 4.3. Peritoneal fluid and endometriosis
5. Clinical implications and future perspectives
6. Acknowledgments
7. References

1. ABSTRACT

Endometriosis is one of the most frequent benign gynecological diseases that affect women. Little is known about the pathogenesis and etiology of endometriosis, despite the numerous studies performed in this field. Although endometriosis is a benign disease, the endometrial tissue, after attachment to the peritoneum, has the ability to grow and invade the surrounding tissues. Similar to neoplastic growth, local extracellular proteolysis might take place, and therefore, the fibrinolytic system may be involved. An altered expression of several components of the fibrinolytic system in the endometrium and peritoneal fluid of women with the disease has been suggested as a key factor in the establishment of the endometriotic lesions. There is evidence of increased fibrinolytic activity in the eutopic endometrium of these women, resulting in endometrial fragments with a high potential to degrade the extracellular matrix and facilitate implantation. The peritoneum possesses an inherent fibrinolytic activity that is responsible for the degradation of the fibrin deposits originated after an injury. This physiological function allows a correct repair of the mesothelium, and therefore, prevents the formation of adhesions. Peritoneal fluid of women with endometriosis and pelvic adhesions has shown to have an increased fibrinolytic activity that may be implicated in reducing the

formation of new adhesions. Endometriotic tissue has abnormal proteolytic capacity, which is determined by modifications of the fibrinolytic parameters in this tissue. Proteolytic status is determined by the imbalance between plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors, which are expressed differently depending on the type of lesion considered and the stage of the disease. The aim of the present study is to review the role of the plasminogen activator system in endometriosis, consider the clinical implications and focus on possible further research efforts and therapeutic applications in this disease.

2. INTRODUCTION

Endometriosis is defined by the presence of endometrial glands and stroma outside the uterus. It is one of the most frequent benign gynecological diseases that affect women with pelvic pain or infertility during their reproductive age (1, 2). The etiology and pathogenesis of endometriosis are far from clear, despite several decades of research in this field. Little is known about the pathogenesis of endometriosis. However, it is thought that retrograde menstruation may transport endometrial tissue to ectopic locations. Several factors have been implicated as causes of endometriosis including immune system

**Lipoprotein (a) in young individuals as a marker of the presence of ischemic heart disease and the severity of coronary lesions**

Esther Zorio
Cristina Falco
Miguel A. Arnao
Francisco España
Ana Osa
Luis A. Ramon
Remedios Castello
Luis Almenar
Miguel A. Palencia
Amparo Estelles

The purpose of this study was to evaluate whether high levels and small isoforms of lipoprotein (a) [Lp(a)] are markers of risk of early myocardial infarction and markers of the severity of coronary atherosclerosis. Lp(a) levels and small apo(a) isoforms were higher in 222 patients than in 199 controls ($p < 0.001$). In patients, Lp(a) ≥ 30 mg/dL was associated with the presence of coronary lesions ($p = 0.007$) and the severity of coronary atherosclerosis ($p = 0.002$). The present study suggests that Lp(a) levels and small isoforms are markers of early myocardial infarction and that Lp(a) levels ≥ 30 mg/dL are associated with severe patterns of coronary atherosclerosis.

Key words: lipoprotein (a), ischemic heart disease, angiography, fibrinolysis, atherothrombosis.

Haematologica 2006; 91:562-565

©2006 Ferrata Storti Foundation

From the Department of Cardiology (EZ, MAA, AO, LA; MAP) and Research Centre, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain (CF, FE, LAR, RC, AE).

Correspondence:
Amparo Estelles, Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Av. Campanar, 21. 46009 Valencia, Spain.
E-mail: estelles_amp@gva.es

Besides cardiovascular risk factors, hemostatic balance may play a role in the onset and progression of atherothrombosis. Lipoprotein (a) [Lp(a)], a part of low density lipoprotein cholesterol, can exert a pro-atherogenic and hypofibrinolytic effect. The size of its glycoprotein component, apolipoprotein(a) [apo(a)], varies significantly¹ as a result of which different isoforms have been identified. Lp(a) concentration is highly inheritable and there is no compelling evidence that Lp(a) levels can be lowered by pharmacological interventions other than hormone replacement therapy.² Although there is evidence indicating that the risk of ischemic heart disease increases with high Lp(a) levels,^{4,5} and/or small apo(a) isoforms,⁷ the specific mechanisms involved are unknown. Basically, Lp(a) can promote atherothrombosis either by decreasing fibrinolytic activity^{7,8} or by enhancing the growth of atheromatous lesions.⁹ The first effect can be explained by two different mechanisms: the competition with plasminogen to bind fibrin¹⁰ and up-regulation of the expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).¹¹ The PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism modulates PAI-1 levels, but whether this polymorphism influences the effect of Lp(a) on PAI-1 levels has not yet been investigated.

The relationship between Lp(a) levels and the severity of coronary atherosclerosis in patients with unstable angina or acute myocardial infarction (MI) has been analyzed in several studies with controversial results,¹²⁻¹⁴ while the potential value of small apo(a) isoforms in predicting severe angiographically demonstrable atherosclerosis

remain unclear. In this study we simultaneously analyzed Lp(a) levels, apo(a) isoforms and the angiographic pattern (presence/absence of coronary lesions and severity of the coronary atherosclerosis) in young stable survivors of MI. We also determined PAI-1 levels and other fibrinolytic parameters to provide a preliminary insight into the mechanism by which Lp(a) may promote atherothrombosis. These variables were also analyzed in controls in order to assess their potential role as markers of ischemic heart disease in young people.

Design and Methods

Our study included 222 subjects, aged < 51 years who had had a MI¹⁵ (Table 1). None of them had a previous history of stroke or malignancy. Blood sampling was performed in a clinically stable condition ≥ 3 months after the acute coronary event. Coronary angiograms were analyzed to establish the absence or presence (luminal narrowing $\geq 70\%$) of significant coronary lesions and the severity of coronary atherosclerosis, which was determined using a stenosis score.¹⁶ According to this score, coronary atherosclerosis was graded as absent (0 points), mild (1-9 points), or severe (≥ 10 points). One hundred and ninety-nine unrelated Caucasian controls from the same geographical area as the patients and with a similar age and sex distribution were enrolled in the study (Table 1). All controls were apparently healthy and none of them had a personal history of thrombotic disease or malignancy. Classical cardiovascular risk factors were



REGULAR ARTICLE

Expression of plasminogen activator inhibitors type 1 and type 3 and urokinase plasminogen activator protein and mRNA in breast cancer

Remedios Castelló ^a, Jose M. Landete ^a, Francisco España ^a,
Carlos Vázquez ^b, Carlos Fuster ^b, Sergio M. Almenar ^b, Luis A. Ramón ^a,
Klaus-Peter Radtke ^c, Amparo Estellés ^{a,*}

^a Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^b Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

^c BIOLEX, Inc., 158 Credle St., Pittsboro North Carolina 27312, USA

Received 27 September 2006; received in revised form 12 November 2006; accepted 4 December 2006
Available online 29 January 2007

KEYWORDS

Breast cancer;
PAI-1;
PAI-3;
uPA;
Gene expression

Abstract

Background: The urokinase plasminogen activator (uPA) system has been involved in cancer cell invasion and in metastasis. uPA activity is controlled by its principal inhibitor, the PA inhibitor type-1 (PAI-1), but it can also be inhibited by PAI-3. Increased levels of uPA and PAI-1 are known to be associated with a poor prognosis in breast cancer. To our knowledge this is the first study of the expression and role of PAI-3 in human breast cancer tissue.

Materials and methods: Protein and mRNA levels were evaluated for uPA, PAI-1 and PAI-3 in breast cancer tissues from 70 different patients. The localization of antigen and mRNA of these proteins was studied by immunohistochemistry and *in situ* hybridization, respectively.

Results: No significant differences were observed for PAI-3 mRNA or protein levels between the nodal status groups or the different post-surgical tumor-node-metastasis (pTNM) stages. However, uPA and PAI-1 mRNA and antigen levels significantly increased at the pTNM stage and in node-positive patients. PAI-3 antigen levels were significantly higher in early relapse-free patients, whereas PAI-1 antigen levels were significantly higher in patients who suffered a relapse. PAI-3 protein and

Abbreviations: PAI-3, plasminogen activator inhibitor type 3; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; uPA, urokinase type plasminogen activator; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

* Corresponding author. Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación. Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 963862797; fax: +34 961973018.

E-mail address: estelles_amp@gva.es (A. Estellés).

0049-3848/\$ - see front matter © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.thromres.2006.12.016

Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems

J. Gilabert-Estellés¹†, L.A. Ramón²†, F. España², J. Gilabert¹, V. Vila², E. Régonon², R. Castelló², M. Chirivella³ and A. Estellés^{2,4}

¹Gynecology Service, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain; ²Research Center, Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Avda Campanar 21, 46009 Valencia, Spain; ³Anatomopathology Department, Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Avda Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

⁴Correspondence address. Tel: +34-96-3862797; Fax: +34-96-1973018; E-mail: estelles_amp@gva.es

BACKGROUND: Endometriosis a highly prevalent, benign disease in which the angiogenic, fibrinolytic and metalloproteinase (MMP) systems may be implicated. The objective of this study is to analyse mRNA expression and protein levels of several angiogenic factors and to correlate them with several components of the fibrinolytic and MMP systems in samples from 71 women with endometriosis and 50 controls. **METHODS AND RESULTS:** Eutopic endometrium showed higher mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients than in controls. However, ovarian endometrioma had lower VEGF mRNA levels than did the eutopic endometrium of patients. Similar results were obtained for VEGF protein levels. On the other hand, a significant increase in thrombospondin-1 (TSP-1) levels was observed in ovarian endometrioma than in eutopic endometrium. The peritoneal fluid from women with endometriosis showed a significant increase in VEGF, urokinase-type plasminogen activator (uPA) and MMP-3 levels than that of controls. A significant correlation was observed between the levels of VEGF and uPA in endometrium and in peritoneal fluid. **CONCLUSIONS:** Endometrium and peritoneal fluid from women with endometriosis have increased levels of VEGF, uPA and MMP-3 levels. Therefore, the development of endometriotic implants at ectopic sites may be facilitated, promoting the progress of the endometriosis.

Keywords: endometriosis; angiogenesis; VEGF; fibrinolytic system; metalloproteinase system

Introduction

Endometriosis, defined as the presence of endometrium outside the uterus, is one of the most frequent benign gynecological diseases (Martínez-Roman *et al.*, 1997; Giudice *et al.*, 1998; Pellicer *et al.*, 2001). Despite its high prevalence and the incapacitating symptoms, the exact pathogenetic mechanisms of endometriosis remain unsolved. It is a multifactorial entity in which the angiogenic, fibrinolytic and metalloproteinase (MMP) systems may be implicated. (Donnez *et al.*, 1998; Gilabert-Estellés *et al.*, 2003, 2005; Bruse *et al.*, 2004; Ramón *et al.*, 2005).

Angiogenesis plays a major role in the pathogenesis of cancer, inflammation, rheumatoid arthritis and other diseases (Folkman, 1995). Angiogenesis is an important event for endometrial growth and tissue repair (Carmeliet, 2003), and abnormal angiogenesis may contribute to several endometrial-related pathologies, such as menorrhagia, endometrial cancer and endometriosis (McLaren *et al.*, 1996; Healy *et al.*, 1998; Girling *et al.*, 2005). Several studies have indicated that angiogenesis

may have an important role in the pathogenesis of endometriosis. Similarly to tumor metastasis, endometriotic implants require neovascularization to proliferate, invade the extracellular matrix (ECM) and establish an endometriotic lesion (Taylor *et al.*, 2002; Laschke *et al.*, 2005). Moreover, it has been suggested that antiangiogenic therapy may be a novel therapeutic approach to endometriosis (Hull *et al.*, 2003; Nap *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2005; Laschke *et al.*, 2006).

Angiogenesis is under the control of numerous inducers, including the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and inhibitors, such as thrombospondin-1 (TSP-1) (McLaren *et al.*, 2000). Endometrium undergoes cyclical growth and regression during the menstrual cycle, which depends on ovarian steroids levels. It is therefore a rich source of angiogenic growth factors, including VEGF. VEGF induces endothelial cell proliferation, migration, differentiation and capillary formation (Breier *et al.*, 1997). Several studies have reported an increase in VEGF levels in endometriosis and it has been suggested that VEGF plays a role in the progression of the disease (Donnez *et al.*, 1998; Fasciani *et al.*, 2000; Takehara *et al.*, 2004).

†J. Gilabert-Estellés and L. A. Ramón have contributed similarly in the present article.



REGULAR ARTICLE

Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4G/5G polymorphism

Eva Solá^a, Amparo Vayá^b, Francisco España^c, Remedios Castelló^c,
Luis A. Ramón^c, Antonio Hernández-Mijares^a,
Vicente Vicente^d, Amparo Estellés^{c,*}

^a Endocrinology Service, Doctor Peset University Hospital, Av. Gaspar Aguilar, 90. 46017 Valencia, Spain

^b Hemorheology and Thrombosis Unit, Service of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Av. Campanar, 21. 46009 Valencia, Spain

^c Research Center, La Fe University Hospital, Av. Campanar, 21. 46009 Valencia, Spain

^d University of Murcia, Centro Regional de Hemodonación, Ronda de Garay s/n, 30003 Murcia, Spain

Received 9 August 2007; received in revised form 8 October 2007; accepted 23 October 2007
Available online 26 November 2007

KEYWORDS

Morbid obesity;
PAI-1;
Fibrinolysis;
Insulin resistance
syndrome

Abstract

Introduction: An association between an increase in plasminogen activator inhibitor type 1 and obesity has been described. It has also been shown that a decrease in adiposity has beneficial effects. However, less information is available regarding morbid obesity and hypofibrinolysis. The aim of the present study was to evaluate the effect of weight loss and the influence of the plasminogen activator inhibitor type 1 promoter 4G/5G genotype on plasminogen activator inhibitor type 1 levels in severe and morbid obesity.

Materials and methods: Sixty-seven obese patients were studied before and three months after a weight reduction program, and compared with 67 controls. We determined plasminogen activator inhibitor type 1 antigen and activity levels, tissue type plasminogen activator antigen levels, 4G/5G genotype and biochemical parameters in both groups.

Abbreviations: PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; BMI, body mass index; VLCD, very low-calorie diet; WHR, waist-hip ratio; t-PA, tissue type plasminogen activator; HOMA, homeostasis model assessment; IR, insulin resistance; T-Chol, total cholesterol; HDL-Chol, high-density lipoprotein-cholesterol; VLDL-Chol, very low-density lipoprotein-cholesterol; CRP, C-reactive protein; LDL-Chol, low-density lipoprotein-cholesterol.

* Corresponding author. Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 963862797; fax: +34 961973018.

E-mail address: estelles_amp@gva.es (A. Estellés).

0049-3848/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.thromres.2007.10.016

Fibrinolytic inhibitor levels and polymorphisms in Behçet disease and their association with thrombosis

José M. Ricart,¹ Luis A. Ramón,² Amparo Vayá,³ Francisco España,² María-Luisa Santaolalla,³ José Todolí,⁴ Remedios Castelló,² Jordi Fontcuberta⁵ and Amparo Estellés²

¹Dermatology Service, ²Research Centre, ³Service of Clinical Pathology, ⁴Internal Medicine Service, La Fe University Hospital, and ⁵Unitat d'Hemostasia i Trombosi, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Summary

This study aimed to assess the fibrinolytic inhibitors and their association with thrombosis in Behçet disease. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) ($P < 0.001$) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels ($P = 0.022$) were significantly higher in 79 patients than in 84 controls. No significant differences were observed in *CPB2* (TAFI) Thr325Ile and *SERPINE1* (PAI1) 4G/5G polymorphism distribution between patients and controls. TAFI activity levels were significantly higher in patients with thrombosis than in those without thrombosis ($P = 0.024$). In conclusion, the increased TAFI levels in Behçet disease could contribute to the increased risk of thrombosis observed in these patients.

Keywords: fibrinolytic inhibitors, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, plasminogen activator inhibitor 1, Behçet disease.

Received 14 November 2007; accepted for publication 2 January 2008

Correspondence: Amparo Estellés, Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain.
E-mail: estelles_amp@gva.es

Behçet disease is a chronic vasculitis characterized by oral and genital ulceration, and an increased risk of developing thrombosis (Koç *et al.*, 1992). Although endothelial injury underlies the thrombotic tendency in Behçet disease, hypercoagulability and hypofibrinolysis may be also important factors in the development of thrombosis (Hampton *et al.*, 1991; Espinosa *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004; Ricart *et al.*, 2006).

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) is the primary inhibitor of plasminogen activation *in vivo* and increased plasma levels of this inhibitor may promote thrombosis. Furthermore, the levels of PAI-1 were found to be related to the *SERPINE1* (PAI1) promoter 4G/5G polymorphism (Seguí *et al.*, 2000). Another fibrinolytic inhibitor, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) acts by inhibiting the assembly of the tissue plasminogen activator (t-PA)-plasminogen complex on fibrin surface, resulting in a decreased plasmin formation (Bajzar, 2000). Increased TAFI levels have been associated with venous thromboembolism (VTE) and cardiovascular disease, although the role of TAFI remains

unclear (Juhan-Vague *et al.*, 2002; Zorio *et al.*, 2003; Martini *et al.*, 2006).

Polymorphisms in the gene encoding TAFI (*CPB2*) could explain such controversial results, either by association of certain polymorphisms with TAFI antigen (ag) levels, or by variable antibody reactivity towards TAFI isoforms. A recent report describes a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that seems to be insensitive to TAFI isoforms (Frere *et al.*, 2005).

To our knowledge, only one study has reported an increase in TAFIag levels in Behçet patients compared with controls, although no significant differences between Behçet patients with and without thrombosis were observed (Donmez *et al.*, 2005). However, no reports about functional levels of TAFI and *CPB2* polymorphisms have been published. Furthermore, TAFIag levels were previously evaluated with an assay that was influenced by *CPB2* genotype (Donmez *et al.*, 2005).

The aim of the present study was to evaluate the polymorphisms and antigenic and activity levels of fibrinolytic inhibitors in Behçet disease and their relationship with thrombosis.

First published online 13 March 2008

doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07078.x Journal Compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 141, 716–719

© 2008 The Authors

Fibrinolysis: The Key to New Pathogenetic Mechanisms

Esther Zorio, Juan Gilabert-Estellés, Francisco España, Luis A. Ramón, Raul Cosín and Amparo Estellés*

Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Servicio de Cardiología y Servicio de Ginecología. Valencia, Spain

Abstract: The fibrinolytic system includes a broad spectrum of proteolytic enzymes with physiological and pathophysiological functions in several processes, such as haemostatic balance, tissue remodeling, tumor invasion, angiogenesis and reproduction.

The main enzyme of the plasminogen activator system is plasmin, which is responsible for the degradation of fibrin into soluble degradation products. The activation of plasminogen into plasmin is mediated by two types of activators, urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type plasminogen activator (tPA). The activity of both is regulated by specific plasminogen activator inhibitors (PAIs). There are 3 types of PAIs described so far but the most important fibrinolytic inhibitor *in vivo* is PAI type 1 (PAI-1). Among others, the presence of metabolic syndrome and the -675 4G/5G promoter polymorphism are known to be modulators of PAI-1 levels. Besides their fibrinolytic profile, plasmin and plasminogen activators are implicated in tissue proliferation and cellular adhesion, as they can proteolytically degrade the extracellular matrix and regulate the activation of both growth factors and matrix metalloproteinases. By all these means, the fibrinolytic system is also involved in physiological processes, and in pathological situations such as thrombosis, arteriosclerosis, endometriosis and cancer.

PAI-1 has been studied in different settings with thrombotic pathophysiology, such as coronary artery disease and ischaemic stroke. Controversial results have been published and concerns about study designs or presence of confounders have been claimed to be responsible of them. Recently, its involvement in adverse thrombotic events related to the modern drug-eluting coronary stents has renewed the interest of its study.

PAI-1 also plays an important role in signal transduction, cell adherence, and migration. Indeed, studies of several types of cancers, including breast cancer, have shown that increased uPA and PAI-1 levels are associated with aggressive tumor behavior and poor prognosis.

Endometriosis is defined by the presence of endometrial glands and stroma outside the uterus with marked ability to attach and invade the peritoneum. It is one of the most frequent benign gynecological diseases that affect women with pelvic pain or infertility during their reproductive age. Immune system disorders, genetic predisposition, altered peritoneal environment and endometrial alterations are believed to increase the susceptibility to endometriosis. The plasminogen activator system may be involved in this process, where local extracellular proteolysis plays a crucial role. Altered expression of several components of the fibrinolytic system in both eutopic and ectopic endometrium and peritoneal fluid of women with the disease has been implicated not only in the onset, but also in the progression of the endometriotic lesions.

Keywords: Fibrinolysis, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), plasminogen activator, thrombosis, cancer, endometriosis, drug-eluting stent thrombosis.

I. FIBRINOLYTIC SYSTEM. GENERAL ASPECTS

The fibrinolytic system includes a broad spectrum of proteolytic enzymes with physiological and pathophysiological functions in several processes such as haemostatic balance, tissue remodeling, tumor invasion, angiogenesis and reproduction [1-8].

The main enzyme of the plasminogen activator system is plasmin, which is responsible for the degradation of fibrin into soluble degradation products (Fig. 1). The activation of plasminogen into plasmin is mediated by two types of activators, urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type plasminogen activator (tPA). The activity of both is regulated by specific plasminogen activator inhibitors (PAIs). The principal PAIs are PAI type 1 (PAI-1), initially called the endothelial cell PAI [1,9]. PAI type 2 (PAI-2), also known as placental-type PAI [10-12] and PAI type 3 (PAI-3), which is identical to protein C inhibitor [13,14]. Plasmin can be inhibited by specific plasmin inhibitors (mainly α_2 -antiplasmin and also α_2 -macroglobulin). Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), another type of fibrinolytic inhibitor, acts as an inhibitor of tPA-dependent fibrinolysis [15-17]. Table 1 shows the principal characteristics of the fibrinolytic system components.

Besides their fibrinolytic function, plasmin and plasminogen activators are implicated in tissue proliferation and cellular adhesion, as they can proteolytically degrade the extracellular matrix and regulate the activation of both, growth factors and matrix metalloproteinases. By all these means, the fibrinolytic system is also

involved in physiological processes, and in pathological situations such as thrombosis, arteriosclerosis, endometriosis and cancer.

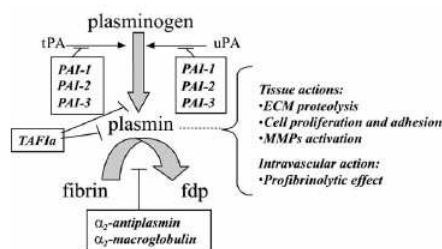


Fig. (1). Simplified diagram of the fibrinolytic system.

tPA: tissue plasminogen activator; uPA: urokinase plasminogen activator; PAI: plasminogen activator inhibitor; TAFIa: activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; fdp: fibrin degradation products; ECM: extracellular matrix; MMPs: metalloproteinases.

Plasminogen and Plasmin

Plasminogen is a glycoprotein mostly synthesized in the liver, although other synthesis sites have also been described, including kidneys, brain testis, heart, lungs, uterus, spleen, thymus and gut [18]. Plasminogen is synthesized as a precursor of 810 amino acids which is then transformed in its mature form, a protein of 791 amino acids [19, 20] (Table 1).

*Address correspondence to this author at the Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Av. Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain; Tel: 34 963862797; Fax: 34 961973018; E-mail: estelles_amp@gva.es



REGULAR ARTICLE

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism and endometriosis. Influence of PAI-1 polymorphism on PAI-1 antigen and mRNA expression

Luis A. Ramón ^{a,1}, Juan Gilabert–Estellés ^{b,1}, Raul Cosín ^a,
Juan Gilabert ^c, Francisco España ^a, Remedios Castelló ^a,
Melitina Chirivella ^d, Alberto Romeu ^b, Amparo Estellés ^{a,*}

^a Research Center, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^b Maternal Hospital, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^c Gynecology Service, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain

^d Anatomopathology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

Received 9 January 2008; received in revised form 6 February 2008; accepted 7 February 2008
Available online 18 April 2008

KEYWORDS

Endometriosis;
Fibrinolysis;
Plasminogen
activator inhibitor-1
(PAI-1);
PAI-1 4G/5G
polymorphism;
PAI-1mRNA

Abstract

Introduction: Endometriosis is a benign gynecologic disease with a high prevalence. It is a multifactorial and polygenic entity in which the fibrinolytic system may be implicated. The objective of this study was to evaluate the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism in a group of women with and without endometriosis and to analyze the influence of this polymorphism in PAI-1 expression in endometrial tissue and peritoneal fluid.

Material and methods: In 389 women (170 patients with endometriosis and 219 controls) PAI-1 4G/5G polymorphism was determined by PCR amplification using allele-specific primers. Quantitative real-time RT-PCR assay was used to quantify PAI-1 mRNA and PAI-1 antigen (ag) levels were quantified by ELISA.

Results: The genotype and allele frequencies of PAI-1 4G/5G polymorphism did not differ significantly between patients and controls. Control women with the 4G/4G genotype had higher endometrial PAI-1ag ($P=0.026$) and mRNA ($P=0.014$) levels than those with the 5G/5G genotype. Control carrying the 4G/4G genotype tended to have higher peritoneal fluid

* Corresponding author. Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación. Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 963862797; fax: +34 961973018.

E-mail address: estelles_amp@gva.es (A. Estellés).

¹ L.A. Ramón and J. Gilabert–Estellés have contributed similarly in the present article.

Fisiopatología del sistema hemostático en la mujer

A. ESTELLÉS¹, J. GILBERT-ESTELLÉS², E. ZORIO³, L.A. RAMÓN¹, R. COSÍN¹, F. ESPAÑA¹

¹ Centro de Investigación. ² Servicio de Ginecología. ³ Servicio de Cardiología.
Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Introducción

A lo largo de la vida de la mujer existen diversas situaciones, tales como la anticoncepción hormonal, la terapia hormonal sustitutiva, la gestación y el puerperio, en las que se puede manifestar un estado de hipercoagulabilidad y, por tanto, una mayor tendencia a fenómenos trombóticos. Es más, ciertas complicaciones obstétricas como los abortos de repetición, el feto muerto intraútero, el desprendimiento prematuro de placenta normalmente inserta (DPPNI) y la preeclampsia grave también podrían considerarse manifestaciones de trombofilia. Por otra parte, con las técnicas de reproducción asistida y, en particular con la fertilización *in vitro*, se han descrito cuadros trombóticos, fundamentalmente ligados al desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica. Por tanto, es importante conocer las modificaciones del sistema hemostático en estas situaciones para poder explicar este aumento de los eventos trombóticos.

La primera referencia de los efectos trombóticos de las hormonas sexuales data de 1961¹, cuando se publicó el caso de una paciente con endometriosis que desarrolló un tromboembolismo pulmonar después de un tratamiento con estrógenos. Desde entonces hasta la actualidad se ha constatado que las hormonas sexuales, tanto endógenas como exógenas, pueden incrementar el riesgo trombótico.

Pero el sistema hemostático, en general, y el sistema fibrinolítico, en particular, no sólo tienen importancia por su relación con los cuadros trombohemorrágicos, sino también por su intervención en otros procesos como la angiogénesis, la invasión tumoral y la reproducción. Estos procesos pueden ser claves en patologías tan prevalentes en la mujer como el cáncer de mama y la endometriosis.

Fisiopatología del sistema hemostático durante la gestación y el puerperio

Cambios hemostáticos durante la gestación normal

Durante la gestación normal se producen modificaciones del sistema hemostático que tienen como finalidad fundamental garantizar una correcta hemostasia durante el parto y el alumbramiento²⁻⁵ (Tabla 1). Dichas modificaciones afectan simultáneamente a

la coagulación, dando lugar a una hipercoagulabilidad, y al sistema fibrinolítico, produciendo una disminución de la actividad fibrinolítica. Por todo ello, se produce un estado protrombótico⁶ que tiene como consecuencia un incremento del riesgo de tromboembolismo venoso en la mujer gestante^{7,8}.

En relación con la coagulación, durante la gestación normal se manifiestan incrementos de factores procoagulantes como factor Von Willebrand (FvW), factores VII, VIII, IX, X y fibrinógeno³⁻⁵. Estas modificaciones protrombóticas no se ven compensadas por los inhibidores de la coagulación, pues tanto la antitrombina (AT) como la proteína C (PC) no sufren variaciones significativas a lo largo de la gestación normal⁽²⁻⁶⁾. Además, los niveles de la proteína S (PS) disminuyen de forma progresiva durante la gestación, reducción que puede mantenerse los primeros días del puerperio^{2,7,9}. A todo ello se añade la existencia de una resistencia adquirida a la PC activada (APC) a lo largo de la gestación^{2,10}. Otros parámetros que indican una activación de la coagulación, como son los fragmentos 1+2 de la protrombina (F 1+2), los dímeros D, el fibrinopéptido A (FPA) y complejos trombina:AT (T:AT) y APC: α_2 antitripsina, se encuentran elevados en la gestación^{5,9,10,11}.

En la mujer gestante se manifiesta un estado de hipofunción fibrinolítica debido, fundamentalmente, a un aumento de los inhibidores fibrinolíticos¹²⁻¹⁶. Los inhibidores de los activadores del plasminógeno de tipo 1 y tipo 2 (PAI-1 y PAI-2) se incrementan a medida que progresa la gestación normal, siendo el aumento del PAI-2 muy superior al del PAI-1. Aunque

Tabla 1. Modificaciones del sistema hemostático durante la gestación normal en comparación con la mujer no gestante

Parámetros	Cambio
Factores VII, VIII, IX y X	↑
Fibrinógeno y factor Von Willebrand	↑
Proteína S	↓
Antitrombina (AT) y Proteína C	=
Resistencia a la Proteína C activada	↑
Fragmento 1+2 de la protrombina, dímeros D, fibrinopéptido A y complejo trombina: AT	↑
Actividad fibrinolítica	↓
Inhibidores fibrinolíticos (PAI-1 y PAI-2)	↑

genetic and acquired. Major unknowns are why the incidence is so steeply related to age, and why factors that are associated with a first event do not predict recurrent events.

Suggested reading

Incidence and fatality

- Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forrier A, Dalen JE. A population based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT study. *Arch Intern Med* 1991; 151: 933-8.
- Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, III. Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study. *Arch Intern Med* 1999; 159: 445-53.
- Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrom J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 692-9.
- Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in western France. *Thromb Haemost* 2000; 83: 657-60.

Epidemiology and risk factors

- Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ, III. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost* 2001; 86: 452-63.
- Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A, Doggen CJM. Venous thrombosis in the elderly. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl 1): 310-7.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-73.

Genetic risk factors

- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Mileteich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-62.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Mileteich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: part 2. *Thromb Haemost* 1996; 76: 824-34.
- Bovill EG, Bauer KA, Dickermann JD, Callas P, West B. The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 1989; 73: 712-7.
- Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, van Pampus EC, Koopman MM, Hamulyak K, Prins MH, van der Meer J, Buller HR. Prothrombin 20210A mutation: a mild risk factor for venous thromboembolism but not for arterial thrombotic disease and pregnancy-related complications in a family study. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1932-7.

Acquired risk factors

- Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005; 293: 715-22.

- Rosendaal FR. Oral contraceptives and screening for factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1996; 75: 524-5.
- Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1371-80.
- Vandenbroucke JP, Rosing J, Bloemenkamp KW, Middeldorp S, Helmerhorst FM, Bouma BN, Rosendaal FR. Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1527-35.
- Cannegieter SC, Doggen CJM, van Houwelingen HC, Rosendaal FR. Travel-related venous thrombosis: Results from a large population-based case control study (MEGA study). *PLoS Med* 2006; 3.

Recurrence risk

- Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA* 2005; 293: 2352-61.
- Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, III. Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 761-8.
- Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet* 2003; 362: 523-6.
- Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. High risk of recurrent venous thromboembolism in men. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2152-5.

NOVEDADES EN HEMOSTASIA E HIPERCOAGULABILIDAD: ARN EN HEMOSTASIA, BIOLOGÍA VASCULAR Y CARDIOPATÍAS

E. ZORIO^{1,2,3}, L.A. RAMÓN^{1,3,4}, P. MEDINA^{1,3,4}, E. FERNÁNDEZ^{1,3}, Ó. CANO^{1,2,3}, J. NAVARRO², A. SALVADOR², F. ESPAÑA¹, A. ESTELLÉS¹, EN REPRESENTACIÓN DE LA UNIDAD DE VALORACIÓN DEL RIESGO DE MUERTE SÚBITA FAMILIAR DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

¹Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación.

²Servicio de Cardiología. ³Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe. Valencia. ⁴RECAVA

Las proteínas son las moléculas biológicas por excelencia, ya que son los constituyentes característicos de las estructuras celulares, y son también las especies que llevan a cabo las funciones celulares más importantes. Las proteínas se encuentran codificadas en el ADN, pero desde el código genético hasta la correcta ejecución de una función celular realizada por una proteína median muchos pasos que son objeto de una estrecha regulación (Tabla 1 y Figura 1).

FIBRINOLISIS Y ENFERMEDADES ENDOCRINAS

A. ESTELLÉS¹, E. ZORIO^{2,5},
J. GILABERT-ESTELLÉS³, L.A. RAMÓN^{1,4},
A. BRAZA BOÏLS^{1,5}, F. ESPAÑA¹

¹Centro de Investigación; ²Servicio de Cardiología;
³Servicio de Ginecología; ⁴RECAVA; ⁵Fundación
para la Investigación del Hospital Universitario
La Fe. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

El funcionamiento del sistema fibrinolítico tiene como base la conversión de una proenzima, el plasminógeno, en su forma proteolíticamente activa, la plasmina, la cual es capaz de degradar la fibrina y, así, eliminar el coágulo previamente formado¹ (Figura 1). La transformación del plasminógeno en plasmina se produce mediante la acción proteolítica de dos enzimas, denominadas activador tisular del plasminógeno (tPA) y activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA).

Cuando la plasmina actúa sobre la fibrina, genera productos de degradación de la fibrina con residuos de lisina en posición carboxiterminal. Estos residuos constituyen sitios de unión para el tPA y el plasminógeno y por ello son responsables de amplificar enormemente la cascada de la fibrinólisis. Como en cualquier proceso biológico regulado, a esta tendencia profibrinolítica se opone una actividad antifibrinolítica, de tal modo que sólo un adecuado equilibrio entre ambas fuerzas dará lugar a un correcto funcionamiento del sistema global².

La inhibición de la fibrinólisis se ejerce a varios niveles (Figura 1). Por una parte, están los inhibidores de los activadores del plasminógeno. El principal inhibidor de la fibrinólisis *in vivo* es el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 o PAI-1, el cual se sintetiza no sólo en el endotelio vascular sino también en el hígado³. Otros inhibidores son el PAI-2, fundamentalmente de origen placentario, del que sólo se detectan niveles plasmáticos significativos en mujeres gestantes^{4,5}, y el PAI-3, que más tarde se identificó como el inhibidor de la proteína C⁶, el cual presenta una mayor concentración plasmática pero una menor actividad antifibrinolítica. También se ha descrito otro mecanismo que regula negativamente la activación del plasminógeno, la vía del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI)⁷. Se sabe que los residuos de aminoácidos básicos (lisina y arginina) exhibidos en la superficie de la fibrina parcialmente degradada sirven de anclaje al plasminógeno y al tPA. Cuando el plasminógeno y el tPA coinciden en la superficie del coágulo de fibrina, tiene lugar la activación del plasminógeno en plasmi-

na. Pues bien, precisamente a ese nivel el TAFI, una vez activado por la trombina (TAFIa), es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina, impidiendo la activación del plasminógeno en plasmina y, por lo tanto, limitando la cascada de la fibrinólisis.

La fibrinólisis también se regula una vez que el plasminógeno ha sido ya activado y transformado en plasmina (Figura 1). Así, la actividad proteolítica de la plasmina está regulada por la acción de la α_2 -antiplasmina, su principal inhibidor fisiológico, y, en menor medida, por la α_2 -macroglobulina y el TAFIa.

Éstos son, básicamente, los factores implicados en la fibrinólisis, de tal modo que una correcta hemostasia depende del balance de fuerzas entre todas estas tendencias opuestas. Por otra parte, el equilibrio entre ellas se encuentra íntimamente relacionado con la coagulación. Hay que resaltar que no se trata de un equilibrio estático, sino tremendamente dinámico y adaptable a diferentes situaciones tanto fisiológicas como patológicas.

Fibrinólisis y enfermedades endocrinas

Desde hace tiempo se han asociado diversas enfermedades endocrinas con modificaciones del sistema hemostático, en general, y del sistema fibrinolítico, en particular. Generalmente, se han observado modificaciones en la coagulación, las plaquetas, el endotelio vascular y la fibrinólisis, que se asocian también con

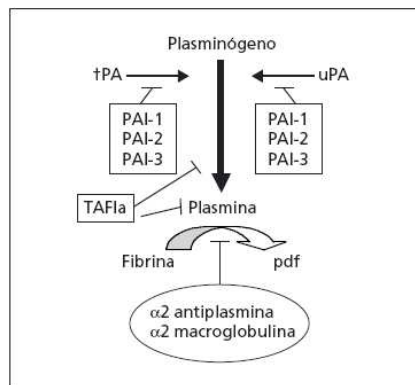


Figura 1. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico. PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; pdf: productos de degradación de la fibrina; TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado; tPA: activador tisular del plasminógeno; uPA: activador del plasminógeno tipo urocinasa.

Vascular endothelial growth factor polymorphisms (−460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression

Raúl Cosín, B.S.,^a Juan Gilabert-Estellés, M.D., Ph.D.,^b Luis A. Ramón, B.S.,^a Francisco España, Ph.D.,^a Juan Gilabert, M.D., Ph.D.,^c Alberto Romeu, M.D., Ph.D.,^b and Amparo Estellés, M.D., Ph.D.^a

^a Research Center and ^b Maternal Hospital Hospital Universitario La Fe and ^c Gynecology Service, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain

Objective: To analyze three functional vascular endothelial growth factor (*VEGF*) polymorphisms (−460C/T, +405G/C, and 936C/T) in women with and without endometriosis and their correlation with *VEGF* expression in endometrial tissue and peritoneal fluid (PF).

Design: Case-control study.

Setting: University-based hospital.

Patient(s): One hundred eighty-six women with endometriosis and 180 controls without the disease.

Intervention(s): Endometrial biopsies were performed by aspiration and PF samples were obtained at laparoscopy.

Main Outcome Measure(s): *VEGF* polymorphisms (−460C/T, +405G/C, and 936C/T) were determined using a polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism assay. Quantitative real-time reverse transcriptase (RT)-PCR assay was used to quantify *VEGF*-A messenger RNA (mRNA) and *VEGF*-A antigen levels were quantified by ELISA.

Result(s): Patients with endometriosis showed a higher *VEGF* 936T allele frequency than controls. However, the distribution of genotypes and allele frequencies in the other two *VEGF* (−460C/T, +405G/C) polymorphisms was similar in the endometriosis and control groups. Endometrium and PF from women with endometriosis showed an increase in *VEGF* levels, but no association was found between the *VEGF* polymorphisms studied and *VEGF* expression in endometrial tissue and PF.

Conclusion(s): These findings suggest that the *VEGF* 936C/T polymorphism may be associated with the risk of endometriosis in a Caucasian population, but the increased *VEGF* levels observed in endometriosis do not appear to be associated with this polymorphism. (*Fertil Steril*® 2009;92:1214–20. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Endometriosis, endometrium, angiogenesis, *VEGF* polymorphisms, *VEGF* mRNA

Endometriosis is a chronic gynecological disease defined as the presence of endometrium outside the uterus (1). It is a multifactorial and polygenic disease in which angiogenesis may be implicated (2–6).

Received April 1, 2008; revised July 9, 2008; accepted August 4, 2008; published online October 20, 2008.

R.C. has nothing to disclose. J.G.-E. has nothing to disclose. L.A.R. has nothing to disclose. F.E. has nothing to disclose. J.G. has nothing to disclose. A.R. has nothing to disclose. A.E. has nothing to disclose.

R. Cosín and J. Gilabert-Estellés have contributed equally to the present article.

This work was supported by research grants from Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Instituto de Salud Carlos III), Fondo de Investigación Sanitaria, Madrid, (FIS PI050799 and PI050844 and Red RECAVA RD06/0014/0004), from Beca Fundación Española de Trombosis y Hemostasia and Beca Fundación Salud 2000 (Serono), Spain.

Reprint requests: Amparo Estellés, M.D., Ph.D., Hospital Universitario "La Fe," Centro de Investigación, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain (FAX: 34-96-1973018; E-mail: estelles_amp@gva.es).

Angiogenesis is under the control of numerous inducers, including the vascular endothelial growth factor (*VEGF*) family (4). Endometrium undergoes cyclical growth and regression during the menstrual cycle, which depends on ovarian steroids levels and is a rich source of angiogenic growth factors, including *VEGF*. The *VEGF* induces endothelial cell proliferation, migration, differentiation, and capillary formation (7). Several studies have reported an increase in *VEGF* levels in endometriosis and it has been suggested that *VEGF* plays a role in the progression of the disease (3, 6, 8–10).

Several polymorphisms have been described in the *VEGF* gene. Some of these variants, −460C/T, +405G/C, and 936C/T, (rs833061, rs2010963, rs3025039, respectively), have been associated with variation in *VEGF* protein production (11, 12) and have been related to several diseases in which angiogenesis is involved (13–15).

Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis

R. Cosín^{1,†}, J. Gilabert-Estellés^{2,†}, L.A. Ramón¹, M.J. Gómez-Lechón¹, J. Gilabert³, M. Chirivella⁴, A. Braza-Boils¹, F. España¹ and A. Estellés^{1,5}

¹Research Center, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain ²Maternal Hospital, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain
³Gynecology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain ⁴Anatomopathology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

⁵Correspondence address. Tel: +34-96-3862797; Fax: +34-96-1973018; E-mail: estelles_amp@gua.es

BACKGROUND: Endometriosis, defined as the presence of endometrium outside the uterus, is one of the most frequent benign gynaecological diseases. It has been suggested that both endometrial and peritoneal factors, related to angiogenesis and proteolysis, can be implicated in this disease. The aim of this study was to evaluate the influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with and without endometriosis.

METHODS: Endometrial cells were isolated, cultured and treated with endometriotic or normal peritoneal fluid. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), urokinase plasminogen activator (uPA), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and their inhibitors including thrombospondin-1, plasminogen activator inhibitor-1 and MMP inhibitor type 1 (TIMP-1) mRNA levels were evaluated by quantitative RT-PCR, and protein levels were quantified by ELISA.

RESULTS: Peritoneal fluid from women with endometriosis induced an increase in VEGF-A and uPA protein and VEGF-A mRNA and uPA mRNA levels in endometrial cell culture from women with ($P < 0.01$) and without endometriosis ($P < 0.05$). The highest levels of VEGF-A and uPA were observed in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and treated with peritoneal fluid from women with endometriosis.

CONCLUSIONS: Peritoneal fluid from women with endometriosis induced more VEGF and uPA expression in endometrial cell culture from women with endometriosis than did normal peritoneal fluid. Endometrial–peritoneal interactions increased angiogenic and proteolytic factors in endometrial cells, which could contribute to the development of endometriotic lesions.

Key words: endometriosis / angiogenesis / proteolysis / peritoneal fluid / endometrial cell culture

Introduction

Endometriosis, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterus, represents one of the most frequent benign gynaecological diseases (Giudice and Kao, 2004). Although the pathogenesis of endometriosis remains controversial, Sampson's

(1927) theory of retrograde menstruation is by far the most widely accepted. Despite its high prevalence and incapacitating symptoms, the exact pathogenic mechanisms of endometriosis remain unsolved. It is a multifactorial disease in which both endometrial and peritoneal factors, related to angiogenesis and proteolysis, may be implicated.

[†]R.C. and G.-E. have contributed equally to this article.

microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors

Luis A. Ramón^{1,†}, Aitana Braza-Boils^{1,†}, Juan Gilabert-Estellés²,
Juan Gilabert³, Francisco España¹, Melitina Chirivella⁴,
and Amparo Estellés^{1,*}

¹Research Center, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain ²Gynecology Service, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain
³Gynecology Service, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain ⁴Anatomopathology Service, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

*Correspondence address. Tel: +34-96-3862797; Fax: +34-96-1973018; E-mail: estelles_amp@gva.es

Submitted on October 20, 2010; resubmitted on January 11, 2011; accepted on January 17, 2011

BACKGROUND: Endometriosis is a common, multifactorial disease in which angiogenesis may be involved in the growth of endometrium outside the uterus. microRNAs (miRNAs) are 21–22 nucleotide non-coding RNAs that regulate gene expression and play fundamental roles in biological processes. The objective of this study was to analyze several miRNAs related to angiogenesis and the angiogenic factors, vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and thrombospondin-1 (TSP-1), in endometriotic lesions (ovarian endometrioma, peritoneal lesion and rectovaginal nodule) and eutopic endometrium from women with endometriosis.

METHODS: TaqMan real-time PCR was used to assess the expression of the miRNAs (miR-15b, -16, -17-5p, -20a, -21, -125a, -221 and -222), while VEGF-A and TSP-1 mRNA were assessed by real-time PCR, with SYBR Green I and VEGF-A and TSP-1 protein levels were quantified by ELISA. Included in the study were 58 women with endometriosis and 38 control women.

RESULTS: In paired samples, ovarian endometrioma showed significantly lower VEGF-A mRNA ($P = 0.02$) and protein ($P = 0.002$) expression than eutopic endometrium and higher expression of miR-125a ($P = 0.003$) and miR-222 ($P < 0.001$). However, ovarian endometrioma had significantly higher expression of the angiogenic inhibitor TSP-1 and lower expression of miR-17-5p than eutopic endometrium ($P < 0.001$). Moreover, a significant inverse correlations between miR-222 and VEGF-A protein levels (-0.267 , $P = 0.018$) and between miR-17-5p and TSP-1 protein levels (-0.260 , $P = 0.022$) were observed. Peritoneal lesions showed a significant increase in VEGF-A in comparison with ovarian endometrioma ($P < 0.01$).

CONCLUSIONS: Expression levels of miRNAs related to angiogenesis were different in eutopic endometrium from that observed in ovarian endometrioma. This could influence the expression of angiogenic factors and play a role in the pathogenesis of endometriosis.

Key words: microRNA / endometriosis / angiogenesis / VEGF-A / TSP-1

Introduction

Endometriosis, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterus, represents one of the most frequent benign gynecological diseases (Balasch *et al.*, 1996; Giudice and Kao, 2004). Despite its high prevalence and the incapacitating symptoms, the exact pathogenic mechanisms of endometriosis remain unsolved. It is a multifactorial and polygenic disease in which angiogenesis may be involved (Shifren *et al.*, 1996; Donnez *et al.*, 1998; McLaren, 2000; Tan *et al.*, 2002; Gilabert-Estellés *et al.*, 2007; Cosin *et al.*, 2009).

In the last decade, numerous gene expression profiling studies have demonstrated that many genes are deregulated in endometriosis (Guo, 2009). miRNAs are 21–22 nucleotide non-coding RNAs that regulate gene expression and play fundamental roles in biological processes. These small molecules bind to target mRNAs, mediating translational repression and/or mRNA degradation (Bartel, 2004). Functional analyses of miRNAs have revealed their significant regulatory influence on the expression of target genes involved in both physiologic and pathologic conditions (Ambros, 2004; Bumey *et al.*, 2009; Ohlsson-Teague *et al.*, 2009, 2010; Kuokkanen *et al.*, 2010). miRNA expression is cell-type-specific, with each miRNA interacting

[†]These authors have contributed similarly in the present article.