

Artículos de Investigación

Elevación de los marcadores de estrés oxidativo en pacientes con endometriosis.

Elevation of oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis.

Raquel Segura R¹, Patricia Cañete SP², Taqua Blanca Ruiz², Patricia Pérez-Moneo P², Lidia Monzó B³

¹ Médico residente de Ginecología y Obstetricia. Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia, España).

² Médico especialista en Ginecología y Obstetricia. Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia, España).

³. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina y Odontología (Valencia, España).

Correspondencia:

Raquel Segura Roselló (raquelsegura3007@hotmail.es). Teléfono 961622346

RESUMEN

Introducción y objetivos: La endometriosis es una de las principales patologías ginecológicas que afecta a mujeres en edad reproductiva. Existen muchas teorías en cuanto a su fisiopatología destacando las alteraciones genéticas y epigenéticas, los desbalances hormonales y otros factores como la inflamación crónica y el estrés oxidativo; pero en realidad, su origen continúa siendo desconocido.

Estudios recientes han implicado al estrés oxidativo y la consecuente generación de radicales libres de oxígeno en la fisiopatología de la entidad mediante la generación de inflamación crónica pélvica. El objetivo de este estudio es corroborar que existen vías de estrés oxidativo que se encuentran alteradas en estas pacientes.

Métodos: Se realizará un análisis de marcadores de estrés oxidativo en plasma sanguíneo, entre ellos los niveles de proteínas carboniladas y el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH), comparando los resultados en pacientes con endometriosis (n=19) versus un grupo control (n=11).

Resultados: existe un incremento de las proteínas carboniladas en las pacientes con endometriosis ($p < 0,041$). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en relación al cociente GSSG/GSH o a los niveles de GSH.

Conclusión: existe evidencia para relacionar al estrés oxidativo con la fisiopatología de la endometriosis, sin poder determinar a día de hoy que vías de oxidación están implicadas.

PALABRAS CLAVE: Endometriosis, estrés oxidativo, glutatión, antioxidantes, especies reactivas de oxígeno.

ABREVIATURAS: Glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSH), cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH), especies reactivas de oxígeno (ROS), , peróxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRx).

ABSTRACT

Introduction and objectives: Endometriosis is one of the main gynecological pathologies that affects women of reproductive age. There are many theories regarding its physiopathology highlighting genetic and epigenetic alterations, hormonal imbalances and other factors such as chronic inflammation and oxidative stress; but actually, its origin continues to be unknown.

Recent studies have implicated oxidative stress and the consequent generation of oxygen free radicals in the physiopathology of the entity through the generation of chronic pelvic inflammation. The objective of this study is to corroborate that there are oxidative stress pathways that are altered in these patients.

Methods: An analysis of oxidative stress biomarkers in blood plasma will be carried out, including carbonylated protein levels and the oxidized/ reduced glutathione ratio (GSSG / GSH), comparing the results in patients with endometriosis (n = 19) versus a control group (n = 11).

Results: there is an increase of carbonylated proteins in patients with endometriosis (p <0.041). There were no statistically significant differences in relation to the GSSG/ GSH ratio or GSH levels.

Conclusion: there is evidence to relate oxidative stress to the pathophysiology of endometriosis, without being able to determine to date which oxidation pathways are involved.

KEY WORDS: Endometriosis, oxidative stress, glutathione, antioxidants, oxygen free radicals.

ABBREVIATIONS: Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSH), oxidized / reduced glutathione ratio (GSSG/GSH), reactive oxygen species (ROS), peroxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRx).

INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una enfermedad crónica definida por la presencia de estroma y glándulas endometriales funcionantes fuera de la cavidad uterina. Afecta entorno al 5-10% de mujeres en edad reproductiva¹ y entre los síntomas más comunes destaca el dolor pélvico crónico, incluyendo la dismenorrea y la dispareunia.

El diagnóstico definitivo de la entidad es anatomopatológico, no obstante, la combinación de síntomas, signos y hallazgos por imagen sugestivos de la enfermedad pueden ayudarnos a establecer un diagnóstico de presunción. Hoy en día no se considera necesario un diagnóstico histológico para diagnosticar la enfermedad y/o tratarla¹. Aunque no existen marcadores patognomónicos de la entidad, el CA-125 puede estar elevado, no obstante, no es un marcador que se deba solicitar de rutina. El algoritmo ROMA, combina los marcadores bioquímicos CA-125 y HE-4, y el estatus pre o postmenopáusico de la mujer con masa pélvica, y se emplea principalmente para la detección de cánceres de ovario. Su papel en el diagnóstico de endometriosis no está definido, sin embargo podría verse elevado en pacientes con la entidad como consecuencia de la elevación del CA-125.

Dentro de su fisiopatología destacan las alteraciones genéticas y epigenéticas², los

desbalances hormonales y otros factores como la inflamación crónica y el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se ha definido como el desequilibrio entre antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ROS), que actúan como agentes oxidantes. Debido a los efectos dañinos de estas especies, los organismos aeróbicos han desarrollado diferentes mecanismos para mantener la estabilidad celular. Dentro de ellos disponemos de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa. En las células, el glutatión se encuentra principalmente en estado reducido (GSH) y, en mucha menor proporción, en su estado oxidado (GSSG). Cuando existe un incremento de radicales peróxido, la glutatión peroxidasa evita su oxidación gracias a la acción de GSH, surgiendo de dicha reacción redox un incremento de GSSG y agua⁴.

En pacientes con endometriosis los niveles de GSH en suero podrían estar disminuidos^{5,6}.

Figura 1.

Por otro lado, la elevación en plasma de proteínas carboniladas constituye también un importante marcador de este proceso, ya que los grupos carbonilo se producen como consecuencia de la interacción de las ROS con los residuos de aminoácidos de las proteínas intracelulares, las

cuales serán liberadas al medio extracelular como consecuencia del daño celular.

Actualmente se acepta que el estrés oxidativo debe estar implicado en la fisiopatología de la endometriosis causando una respuesta inflamatoria generalizada en la cavidad peritoneal^{8,9,10}. No obstante los datos publicados aún no son concluyentes, y no está claro si la endometriosis constituye uno de los factores causales de estrés oxidativo o si aparece como consecuencia del incremento del mismo.

El objetivo principal de nuestro estudio consiste en detectar y describir como se comportan dos potentes marcadores de estrés oxidativo, y el marcador tumoral ROMA en pacientes con endometriosis, comparando dichos resultados con los de un grupo control, libre de enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el año 2016 se inició el reclutamiento de mujeres para la formación de una seroteca de pacientes con endometriosis. Se incluyeron todas aquellas pacientes en edad fértil con diagnóstico clínico o anatomopatológico de endometriosis. Entendemos por diagnóstico clínico la presencia de sintomatología típica de endometriosis junto con hallazgos por imagen altamente sugestivos de la entidad. Se excluyeron todas aquellas pacientes con diagnóstico dudoso o con resultados anatomopatológicos no concluyentes.

En 2017, con una muestra de 19 pacientes se decide realizar un primer análisis mediante un estudio de casos y controles. Como grupo control (n=11) se seleccionaron mujeres en edad fértil sin patología ginecológica conocida, en las que se solicitó una analítica sanguínea rutinaria por otro motivo ginecológico. Todas las pacientes fueron informadas previamente de los objetivos del estudio y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

En las pacientes incluidas en el estudio se evaluaron diferentes factores como fueron el grado de enfermedad endometriósica, así como la presencia de factores de riesgo de estrés oxidativo (factores de riesgo cardiovascular, tabaquismo o índice de masa corporal elevado). Mediante la extracción de una analítica sanguínea, se evaluaron los niveles en plasma de GSH, GSSG, proteínas carboniladas, HE-4 y CA-125, con la combinación de estos dos últimos se calculó en índice ROMA.

Para la determinación del CA-12.5 y el HE4 se emplearon los autoanalizadores Architect-i2000 de

Abbott®. Ambos ensayos utilizan la tecnología CMIA (inmunoanálisis quimioluminiscentes de micropartículas).

La determinación de GSSG, GSH y proteínas carboxiladas se realizaron con determinación espectrofotométrica utilizando los Kit Cayman Chemicals. El almacenamiento de la muestra se realizó en equipos de -80 °C.

Las variables cualitativas se resumen mediante recuentos y porcentajes, mientras que para las variables cuantitativas se recurre a la media y la desviación típica. Para comprobar la normalidad se realiza el test de Shapiro-Wilks, y en función del resultado se utiliza la correspondiente prueba paramétrica (test t de Student) o no paramétrica (U de Mann-Whitney). Todos los contrastes se han realizado con un nivel de significación de 0.05. Todos los análisis se realizaron con el software IBM SPSS v25.

Tabla 1.

RESULTADOS

Los resultados iniciales obtenidos vienen resumidos en la siguiente tabla (tabla 2); se apreció una elevación del índice ROMA de manera estadísticamente significativa (p 0,025) en pacientes con endometriosis respecto el grupo control.

No existen diferencias estadísticamente significativas en relación a los niveles de GSH en pacientes con endometriosis vs grupo control (p> 0,05). Derivado de este primer resultado, tampoco encontramos diferencias entre los dos grupos en cuanto al incremento del cociente GSSG/GSH.

En cuanto a la concentración de proteínas carboniladas, se ha visto un incremento significativo (p < 0,041) de sus niveles en las pacientes con endometriosis en comparación con el grupo control.

No ha sido posible evaluar la repercusión de otros factores de estrés oxidativo, como el tabaco o la obesidad, en la génesis o gravedad de la endometriosis debido a la escasa incidencia de los mismos en la muestra.

Tabla 2.

DISCUSIÓN

La elevación del índice ROMA observada en mujeres que sufren endometriosis podría estar justificada por el aumento del CA-125, el cual pese a no ser un marcador específico de la enfermedad, se

emplea en muchas ocasiones en el cribado inicial de estas pacientes^{11,12}.

Existen numerosos intentos por entender los mecanismos de establecimiento y desarrollo de la endometriosis, y la forma en la que el estrés oxidativo se encuentra involucrado en todo el proceso. La capacidad antioxidante parece estar reducida en mujeres con la enfermedad^{13,14}, aunque no están totalmente claras qué vías están afectas. Se cree que la glutatión peroxidasa juega un papel importante, no obstante todavía es difícil demostrarlo, principalmente podría ser debido a la heterogeneidad entre los estudios y las muestras que se consideran.

Coincidiendo pues con varios estudios que analizaron los niveles de GSH tanto en sangre como en líquido peritoneal^{15,16,17} no se ha visto que sus niveles estén más elevados en la muestra control. Aunque sí es cierto que en otros grupos de investigación, sí defienden su papel. Romao et al¹⁸ postulan que niveles de GSH $\leq 137,8$ nMol/l podrían ser predictores de moderada o severa endometriosis (S 93,7 %, E 54,5%), ya que significaría una alta actividad de la glutatión peroxidasa y una elevación a cambio de GSSH. Esto se traduce en que los niveles de GSH en suero podrían estar correlacionados inversamente con los estadios de la endometriosis, ya que es posible que los niveles séricos más bajos de glutatión estén relacionados con un mayor consumo de este antioxidante debido a una mayor producción de ROS asociada con la gravedad de la enfermedad.

Por otro lado, los marcadores de daño celular secundario a estrés oxidativo, como son las proteínas carboniladas, sí parecen estar elevados en pacientes con endometriosis. Lo que corrobora que existe un proceso inflamatorio que induce la activación de macrófagos trayendo como consecuencia la lesión de los lípidos de membranas y la oxidación de proteínas, y como fin último, la muerte celular.

CONCLUSIÓN

A día de hoy, existe suficiente evidencia científica que implica al estrés oxidativo como una pieza clave en la fisiopatología de la endometriosis. No obstante, la existencia de gran diversidad de marcadores bioquímicos hace difícil establecer de forma precisa las vías implicadas en el proceso, de hecho todavía no está claro el mecanismo oxidativo principalmente implicado en el mismo.

A la diversidad de marcadores se une la existencia de múltiples factores de confusión, como pueden ser el tabaquismo, obesidad, factores de riesgo

cardiovascular u otras entidades que puedan activar por otras vías los mecanismos de estrés oxidativo.

A pesar de la escasa n del estudio, los resultados obtenidos son un aliciente para continuar con esta línea de investigación. Podemos afirmar que existe daño celular en las pacientes con endometriosis, y esto se demuestra con la elevación de las proteínas carboniladas en las pacientes. Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos implicados.

Nuestros datos coinciden con otros estudios en la dudosa implicación del glutatión, lo que daría pie a la necesidad de análisis de otras vías de estrés oxidativo.

El interés de este estudio piloto y la consecuente creación de una seroteca de pacientes radica en establecer un campo de investigación basado en la búsqueda de marcadores de estrés oxidativo, prooxidantes o antioxidantes que puedan favorecer el diagnóstico temprano y el seguimiento de las mujeres con endometriosis..

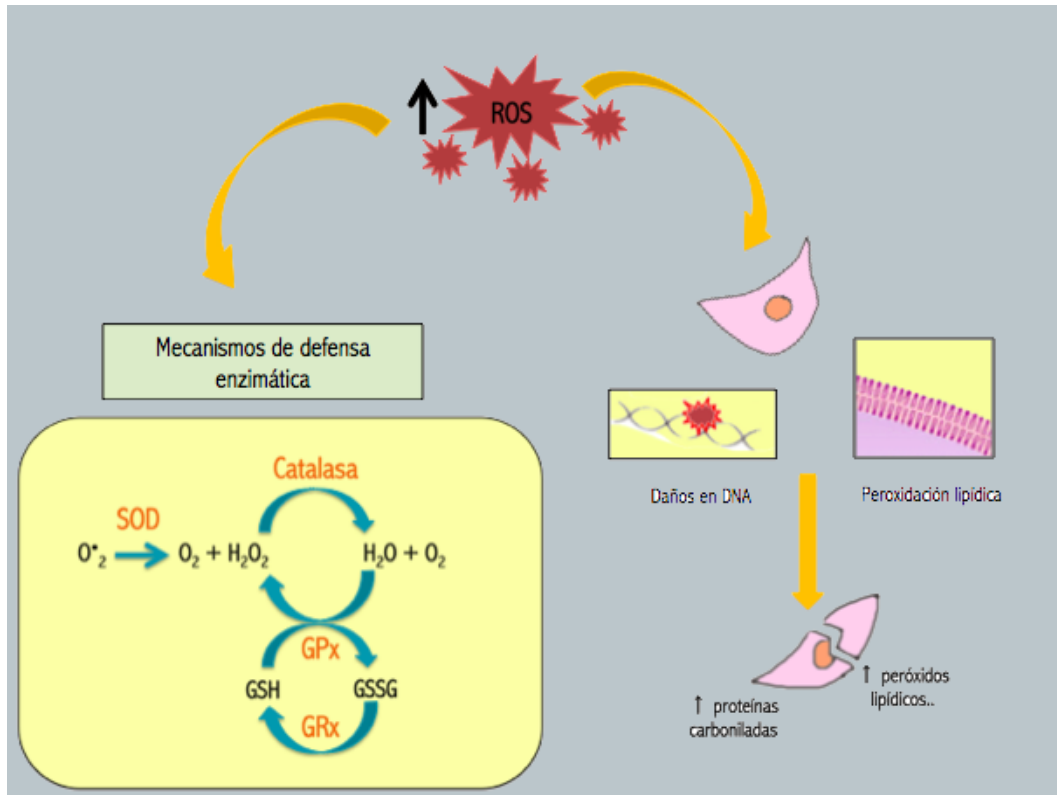
BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Guías de asistencia práctica: endometriosis. 2013. Hallado en: sego.es/Guias_de_Asistencia_Practica#endoscopia. Último acceso 6 de enero de 2019.
2. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 2004; 160:784.
3. Márquez-Lázaro J, Viola-Rhenals M, Monterrosa-Castro A. Association between pelvic endometriosis and oxidative stress. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 2013; 64(2): 178-189
4. Monzo-Beltrán L, Vázquez-Tarragón A, Cerdà C, García-Pérez P, Iradi A, Sánchez C et al. One-year follow-up of clinical, metabolic and oxidative stress profile of morbid obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. 8-oxo-dG as a clinical marker. *Redox Biology* 12 (2017) 389–402
5. Donabela F, Andrade A, Rodrigues J, Dib L, Jordao A, Navarro P. Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis and controls. *Fertil Steril.* 2010;94:S40.
6. Song M, Dominguez C, Lowe E, Parthasarathy S, Murphy AA. Antioxidants (vitamins E and C) decrease Bcl2/increase apoptosis in eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2004;82:S166-S167.

7. Kavoussi SK, Odenwald KC, As-Sanie S, Lebovic DI. Incidence of ovarian endometrioma among women with peritoneal endometriosis with and without a history of hormonal contraceptive use. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017; 215:220.
8. Lousse J. C., Van Langendonck A., Defrere S., Ramos R. G., Colette S., Donnez J. Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 2012;4:23–40. doi: 10.2741/e358
9. Van Langendonck A., Casanas-Roux F., Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility.* 2002;77(5):861–870. doi: 10.1016/S0015-0282(02)02959-X.
10. Scutiero G, Iannone P, Bernardi G, Bonaccorsi G, Spadaro S, Bolta CA et al. Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7265238.
11. Kitawaki J, Ishihara H, Koshiba H, Kiyomizu M, Teramoto M, Kitaoka Y et al. Usefulness and limits of CA-125 in diagnosis of endometriosis without associated ovarian endometriomas, *Human Reproduction.* 2005; 20 (7):1999–2003.
12. Bianchi P Marcelo, Macaya P Rodrigo, Guillermo Durruty V, Manzur Y. Alejandro. Correlación entre valores del marcador Ca-125 con la presencia y severidad de endometriosis pelviana. *Rev. méd. Chile [Internet].* 2003 Abr [citado 2019 Ene 06] ; 131(4): 367-372. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_artt&pid=S0034-98872003000400003&lng=es.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872003000400003>.
13. Savaris AL, Amaral VF. Nutrient intake, anthropometric data and correlations with the systemic antioxidant capacity of women with pelvic endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;158:314-8.
14. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril.* 2003;79:1288-93
15. Donabela F, Andrade A, Rodrigues J, Dib L, Jordao A, Navarro P. Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis and controls. *Fertil Steril.* 2010;94:S40.
16. Kyo S, In Yang H, Eun K, Yeon H, Cho S, Sik Y, et al. The roles of thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in endometriosis. *Hum Reprod.* 2010;25:1251-8.
17. Rodrigues J, Dib L, Melo A, Cardoso R, Romao G, Navarro P. Analysis of serum markers of oxidative stress response in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril.* 2009;92:S113.
18. Romao G, Zyman A, Rodrigues J, Dib L, Ferriani R, Navarro P. Relationship between serum markers of oxidative stress and endometriosis stage in endometriosis-associated infertility women. *Fertil Steril.* 2009;92:S221

TABLAS

FIGURA 1



Leyenda: peróxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRx)

TABLA 1

Parámetro		Casos	Controles
Edad	Media	34,77	30,17
Tabaco	Sí	6 (31,59%)	0
	No	13 (68,41%)	14 (100%)
Alcohol	Sí	2 (10,53%)	1 (9,09%)
	No	17 (89,43%)	13 (90,91%)
IMC	Media	22,98	22,56

TABLA 2

Parámetro	Estadístico	Prueba T Student	
		Controles (n= 11)	Casos (n=19)
Índice ROMA	Media	3,918	8,311
	Varianza	2,200	48,924
	T Student	-2,055	
	p	0,025	
GSH	Media	2,688	2,832
	Mediana	2,714	2,863
	Varianza	0,149	0,045
	p	>0,05	
%GSSG/GSH	Media	49,566	50,016
	Varianza	5,444	19,319
	T Student	-0,286	
	p	0,389	
Proteínas carboniladas	Media	9,432	13,537
	Varianza	28,581	19,723
	T Student	-1,832	
	p	0,041	