

Esterilidad femenina, estrés oxidativo y autoinmunidad

Female sterility, oxidative stress and autoimmunity

A. Iborra y P. Martínez

Unidad de Inmunología. Instituto de Biotecnología y de Biomedicina.
Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona, Spain)

Resumen

La capacidad de implantación de un embrión en el epitelio uterino es un proceso muy complejo que depende de las cualidades del endometrio, tanto de su receptividad como de su estado. Los radicales libres y citocinas presentes en el útero en el momento de la implantación, juegan un papel decisivo a la hora de permitir o no, una correcta implantación embrionaria. La presencia de este tipo de moléculas se han descrito en diferentes patologías ginecológicas asociadas con esterilidad y, por tanto, refuerzan la hipótesis sobre el papel clave que éstas pueden jugar. En esta revisión se pretende dar una visión general sobre el papel de estas moléculas en la implantación embrionaria así como en la aparición de autoinmunidad.

Palabras clave: Esterilidad femenina. Estrés oxidativo. Autoinmunidad.

Summary

The capacity of embryo implantation in uterine epithelium is a very complex process that depends on the qualities of the endometrium, as much of its receptivity as of its state. The free radicals and cytokines presents in the uterus at the moment of implantation play a decisive role at the time of allowing or no, a correct embryo implantation. The presence of this type of molecules has been described in different gynecological pathologies associated with sterility and, therefore, they reinforce the hypothesis on the key paper that these can play. In this revision it is tried to give a general vision on the paper of these molecules in the emryonic implantation as wel as in the appearance of autoimmunity.

Key words: Female sterility. Oxidative stress. Autoimmunity.

Correspondencia: Dr. D. Antoni Iborra
Unidad de Inmunología. Instituto de Biotecnología y de
Biomedicina.
Universidad Autónoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona, Spain)
e-mail: antoni.iborra@uab.cat

El nacimiento en 1978 de Louise Brown utilizando la técnica de fecundación in vitro (FIV) realizada por el grupo de Steptoe y Edwards(1), supuso una opción real de tratamiento para las parejas infértiles y estériles, que incluyen hoy en día alrededor del 10% de las parejas en edad reproductiva. Sin embargo, los procedimientos de FIV no están exentos de dificultades y barreras que debemos ir superando para aumentar la tasa de gestación. El desarrollo de nuevos medios de cultivo que mejoren la calidad embrionaria y la optimización de las muestras de semen se encuentran en continuo desarrollo. Por otro lado, los tratamientos de estimulación ovárica para la superovulación de las pacientes nos permite rentabilizar los procesos de FIV obteniendo un número de ovocitos suficientes para garantizar la transferencia embrionaria (TE).

A pesar de los continuos avances en el desarrollo e implementación de tratamientos clínicos, así como de las técnicas de reproducción asistida, las tasas de implantación embrionaria no sufren un aumento proporcional. La capacidad de implantación de un embrión en el epitelio uterino es un proceso complejo, que depende de las cualidades del endometrio. El endometrio tiene un periodo de receptividad muy corto (ventana de implantación) y ocurre aproximadamente 7 días después de la ovulación. La presencia de pinópodos en el endometrio incrementa la receptividad endometrial. Estos pinópodos aparecen cuando los niveles de progesterona aumentan en la fase lutea del ciclo menstrual. Se ha visto que existen moléculas de adhesión implicadas en la unión del embrión al endometrio (2). Cualquier factor que altere el endometrio, alterará la tasa de implantación embrionaria.

Durante mucho tiempo se ha cuestionado la existencia de autoinmunidad en el tracto reproductivo, en aquellas patologías que son causantes de esterilidad. Muchas de estas enfermedades, como por ejemplo la obstrucción de las trompas de Falopio, o la endometriosis, que consiste en la implantación de células endometriales fuera de la cavidad uterina, cursan con la generación de estrés oxidativo (3). En los últimos años, se ha observado un componente inmunitario en este tipo de patologías ginecológicas: la baja activación de células natural killer (NK), el estado alterado de macrófagos presentes en el peritoneo (4), la presencia de autoanticuerpos (5). Nuestro grupo ha descrito la presencia de anticuerpos antiendometrio (AEA) en el suero de mujeres con obstrucción de las trompas de Falopio (6) y en endometriosis (7). En este último trabajo, se observa como la presencia de AEA está relacionada con la progresión de la endometriosis. La modificación oxidativa de lípidos y proteínas del propio endometrio, debido a la generación

de estrés oxidativo, puede contribuir a la aparición de autoanticuerpos. El componente autoinmunitario de estas patologías ginecológicas es similar al de otras enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn o la psoriasis (4) y está relacionado con una elevada inflamación, expresión de citocinas, apoptosis y necrosis alteradas, entre otros factores. En diferentes enfermedades ginecológicas se observa en la cavidad peritoneal un incremento del número de macrófagos y linfocitos. Estas células son las responsables de la secreción de mediadores inflamatorios que afectan a la fisiología del endometrio. El endometrio está sometido a distintas condiciones cíclicas a lo largo del ciclo menstrual, y las células endometriales están programadas para morir al final del ciclo, mediante un proceso de apoptosis y necrosis (8). Diferentes moléculas generadas en el proceso de estrés oxidativo, así como la presencia de autoanticuerpos específicos de lípidos y proteínas de la superficie endometrial, pueden alterar la receptividad del endometrio para el embrión. Esto explicaría las bajas tasas de implantación que se consiguen cuando las pacientes estériles son remitidas a FIV, incluso en aquellas mujeres que no presentan anticuerpos antiendometrio. El estrés oxidativo participaría: 1) modificando la funcionalidad de moléculas con función receptora del endometrio, 2) alterando la antigenicidad de moléculas (lípidos y proteínas) de las células endometriales y 3) favoreciendo la aparición de autoinmunidad debido al aumento del daño tisular ocasionado, que puede resultar irreversible. A continuación describiremos en que forma pueden participar este conjunto de moléculas generadas en procesos de estrés, y como está relacionado con la esterilidad.

PRESENCIA DE RADICALES LIBRES

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en el ciclo menstrual de la mujer, regulando la función de las células endometriales (9). Las funciones de las ROS en el endometrio aparecen mediadas por la prostaglandina F2 α principalmente al final de la fase secretora y en el momento de la menstruación en que aumentan las ROS (10). Así, en situaciones de estrés oxidativo, la oxidación lipídica es la responsable del aumento de expresión de la prostaglandina F2 α , y ésta, de los niveles de ROS que afectarán a la función de las células endometriales. Otra molécula generada en la respuesta inflamatoria, y que tiene un papel importante en el estrés oxidativo, es el óxido nítrico (NO). El NO se produce por la

rápida conversión de L-arginina a L-citrulina (11) y es generado, durante el estrés oxidativo, por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Altas concentraciones de NO son importantes para mediar la actividad antimicrobiana y antitumoral, además el NO actúa como molécula proinflamatoria. El NO es producido por macrófagos peritoneales y puede afectar a la fertilidad por diferentes mecanismos, resultando tóxico para el espermatozoide, tóxico para el embrión, e inhibiendo la implantación del mismo (11).

PRESENCIA DE CITOCINAS

Estudios realizados durante los últimos cinco años, hacen referencia, al importante papel que tienen los linfocitos, los macrófagos, las células natural killer (NK) y las citocinas (Th1 y Th2) en el éxito o fracaso del embarazo (12). Se ha observado, en endometrio de ratón, que en los sitios donde se han reabsorbido embriones, se encuentran infiltrados de células NK y abundantes macrófagos activados. Por otro lado, se ha podido comprobar experimentalmente, que la administración exógena de citocinas: TNF α , INF γ e IL-2 a animales gestantes induce abortos.

Evidencias experimentales han confirmado la participación de diversas citocinas (inflamatorias y no inflamatorias) en la regulación de la decidualización del endometrio, así como en la implantación del embrión y en el desarrollo embrionario. Una de las citocinas más estudiadas, en estos procesos, ha sido el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) (13). Diversos estudios demuestran que el TNF α tiene un papel fundamental en el contexto de las interacciones que se llevan a cabo durante la implantación del embrión en el útero. Se ha estudiado, en un modelo *in vivo* en roedores, el aumento de la síntesis de TNF α en el útero durante la implantación, así como la presencia de receptores de TNF α en el blastocisto y en las células del trofoectodermo (14). Durante la gestación, se inhibe la regulación de las citocinas de tipo Th1 (IL-2, INF γ y TNF β) (15). Se ha podido comprobar en modelos animales que, durante el período periimplantacional del embrión, existe una activación de las citocinas Th2 protegiendo al implante. La confirmación de estos procesos observados en modelos animales ha sido limitado en humanos, debido a los escasos trabajos realizados hasta el momento sobre el papel de las citocinas Th1/Th2 (15).

En diversos ensayos clínicos realizados en humanos, se ha tratado de esclarecer el papel que desempeñan diversas citocinas, como la IL-1, IL-6 y TNF α , en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la

infertilidad femenina. Entre las enfermedades estudiadas se encuentran la endometriosis, la infertilidad inducida por procesos autoinmunes y en los casos de infertilidad de origen desconocido. Estudios realizados en mujeres con endometriosis demuestran una relación entre los niveles de IL-1 y TNF α en líquido peritoneal y el grado de adhesiones presentes en la paciente (16).

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN/RECEPTORES

También son de gran interés algunas moléculas presentes en la membrana de las células del endometrio, por su papel como receptoras, con una función de adhesividad, que permitirán la implantación embrionaria, como por ejemplo: la familia de proteínas ERM (ezrina, radixina y moesina) (17), la integrina $\alpha 3 \beta 3$ (18) o proteínas como la epsialina, con una función antiadherente, que puede actuar como agente repelente o antiadhesivo que impedirá la correcta implantación del embrión (19). La presencia/ausencia de estas moléculas en situaciones de estrés oxidativo, cuando el embrión puede implantar en el endometrio, puede jugar un papel determinante para explicar la mala tasa de implantación de pacientes estériles.

PRESENCIA DE APOPTOSIS

El ciclo endometrial consiste fundamentalmente en tres fases bien definidas (proliferativa, secretora y menstrual). Varias evidencias coinciden en señalar que la apoptosis (muerte celular programada) mantiene la homeostasis celular, eliminando las células endometriales, durante la fase secretora tardía y la fase menstrual. Por otro lado, la apoptosis está involucrada en diversos procesos como la morfogénesis, tolerancia inmune, crecimiento de células malignas, autoinmunidad en enfermedades degenerativas del sistema nervioso, así como en la implantación del blastocisto. La homeostasis celular se ve alterada en pacientes estériles. En endometriosis, los implantes ectópicos tienen una relativa resistencia a la acción citotóxica mediada por macrófagos. Esta situación hace pensar, que en esta patología ocurre un fenómeno de pérdida del control homeostático en el tejido endometrial. Estudios que valoran la apoptosis en mujeres con endometriosis han señalado que la apoptosis disminuye en el endometrio eutópico, pero que esta disminución es mayor en el tejido ectópico si se compara con los resultados obtenidos en pacientes normales (20). El ovario promueve la

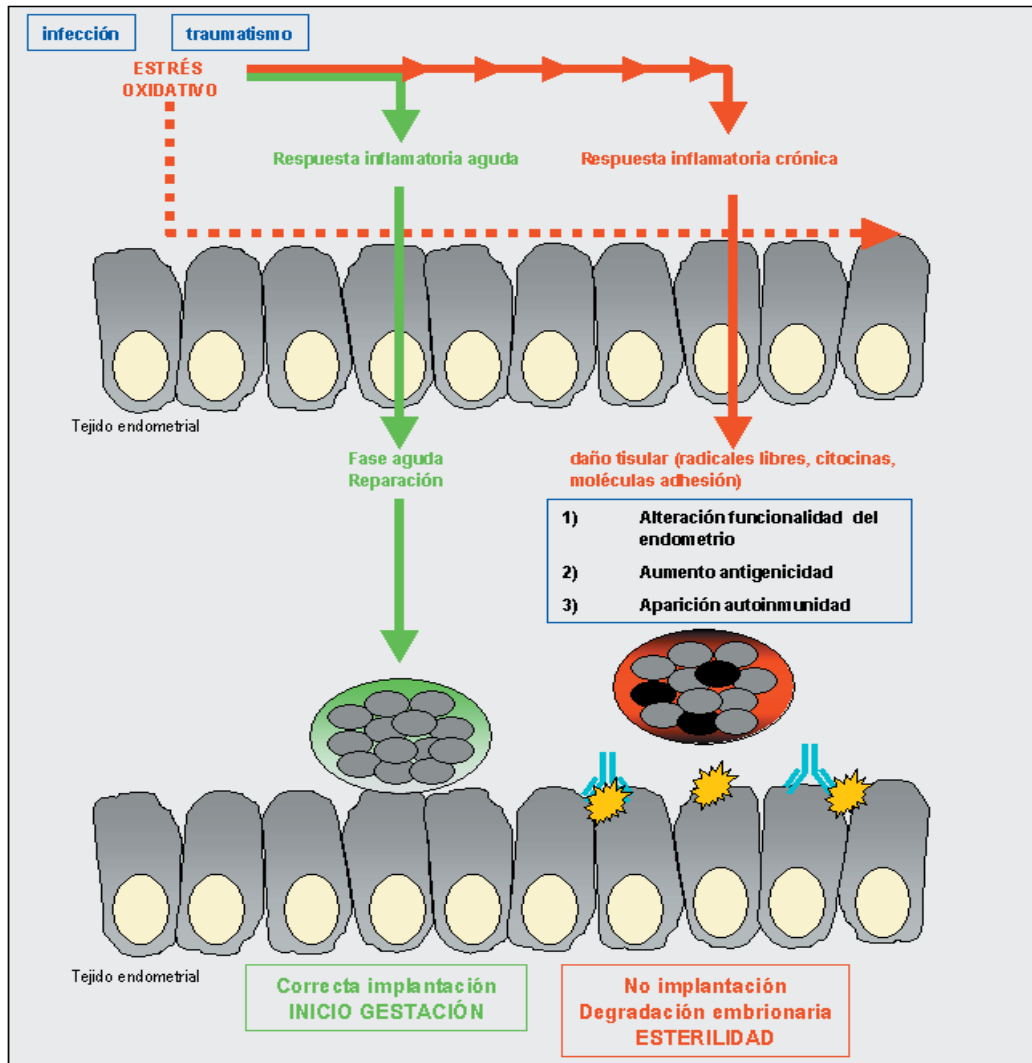


Figura 1

El endometrio uterino es diana del estrés oxidativo generado por diferentes causas, entre otras infecciones genitales, traumatismos. El estrés oxidativo generado suele ser compensado por las defensas antioxidantes presentes en las células. Ante un estímulo de estrés, aparece una respuesta inflamatoria aguda que, mediante la fase inflamatoria aguda de secreción de citocinas y la fase de reparación, garantizará la funcionalidad del endometrio y, por tanto, la correcta implantación del embrión e inicio de la gestación. Uno de los máximos problemas a los que nos enfrentamos es cuando la fuente que origina el estrés oxidativo se prolonga durante mucho tiempo, o se generan episodios de estrés oxidativo de forma repetitiva. En estos casos, la respuesta inflamatoria puede llegar a establecerse de forma crónica generándose un grave daño tisular que puede llegar a ser irreversible debido a la presencia de radicales libres, de diferentes citocinas o a la expresión o inhibición de expresión de determinadas moléculas de la superficie de la célula endometrial. Este tipo de moléculas pueden modificar oxidativamente lípidos y proteínas de la superficie de las células endometriales alterando así su funcionalidad, así como su antigenicidad lo que favorecerá la aparición de autoinmunidad. Así, la pérdida de funcionalidad por modificación oxidativa, o el bloqueo físico por la presencia de autoanticuerpos dificultará la implantación embrionaria dando lugar a la esterilidad.

necrosis y la apoptosis en las células endometriales a través del control hormonal de esteroides, y estos mecanismos están involucrados en la regulación cíclica del endometrio y la menstruación (20). De igual forma, se plantea que el endometrio puede mejorar el desarrollo embrionario modificando el estado apoptótico del embrión (21).

AGENTES ANTIOXIDANTES COMO TERAPIA

El estrés oxidativo, con un incremento de radicales libres en el medio, origina daño al tejido endometrial. Este fenómeno se ha descrito en diferentes procesos patológicos como cáncer, envejecimiento celular, inflamación (22). La membrana plasmática resulta diana del ataque de los radicales libres, y éstos pueden causar la peroxidación lipídica, por la que diferentes funciones de la membrana se alteran, se inactivan enzimas y la fluidez de membrana también se ve modificada. Los antioxidantes, como la vitamina E (α -tocoferol) o diferentes flavonoides protegen a la membrana de este ataque oxidativo. Se ha descrito la capacidad antioxidante de la vitamina E en múltiples modelos in vitro o in vivo (23), así como la de los flavonoides (24). Los flavonoides son compuestos naturales que también actúan como excelentes antioxidantes de modo similar a la vitamina E. Estos compuestos, no comportan los problemas que la vitamina E puede ocasionar en una terapia administrada a largo plazo (22). Los antioxidantes (vitamina E y flavonoides) actúan inhibiendo la producción de mediadores proinflamatorios, que causan citotoxicidad y daño tisular (25). Se ha descrito la administración de antioxidantes en modelos experimentales en humano en diferentes patologías (26). En la infertilidad masculina se ha utilizado ampliamente, en los casos en que aparecen graves alteraciones en el movimiento y concentración de los espermatozoides, debidas a la presencia de radicales libres. La aplicación de terapia antioxidante tiene efectos positivos en la funcionalidad del espermatozoide, aunque un único estudio muestra tener un efecto significativo sobre las tasas de embarazo (27). En el modelo reproductivo femenino, no existen estudios específicos en los que se valore el efecto de la terapia antioxidante sobre la funcionalidad del endometrio, ni su correlación con los resultados de la fecundación in vitro, por lo que en un futuro cercano nos planteamos investigar los efectos que este tipo de terapia pueda aportar en la clínica humana, en el intento de dar respuesta a las aspiraciones reproductivas de parejas estériles.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Stephoe PC, Edwards RG.:** Birth after te re-implantation of a human embryo. *Lancet*, 1978; 2: 366.
2. **Stavréus-Evers A, Nikas G, Eriksson H, Sahlin L, Landgren BM.:** The formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentration of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril*, 2001; 76: 782-791.
3. **Murphy AA, Santanam N, Parthasarathy S.:** Endometriosis: A disease of oxidative stress?. *Sem Reprod Endocrinol*, 1998; 16(4): 263-273.
4. **Nothnick WB.:** Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril*, 2001; 76(2): 223-231.
5. **Gleicher N, El-Roeiy A, Confino E, Friberg J.:** Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol*, 1987; 70: 115-122.
6. **Palacio JR, Iborra A, Gris JM, Andolz P, Martínez P.:** Anti-endometrial autoantibodies in women with diagnosis of infertility. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 38: 100-105.
7. **Iborra A, Palacio JR, Ulcova-Gallova Z, Martínez P.:** Autoimmune response in women with endometriosis *Am J Reprod Immunol*, 2000; 44: 236-241.
8. **O'Reilly LA, Strasser A.:** Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res*, 1999; 48: 5-21.
9. **Narimoto K, Noda Y, Shiotani M.:** Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Acta Histochem Cytochem*, 1990; 23: 487-498.
10. **Sugino N, Karube A, Kashida S, Takiguchi S, Kato H.:** Reactive oxygen species stimulate prostaglandin F2a production in human endometrial stromal cells in vitro. *Human Reprod*, 2001; 16(9): 1797-1801.
11. **Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB.:** Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*, 2002; 77(1): 46-51.
12. **Clark DA, Arck PC, Chaouat G.:** Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol*, 1999; 41-22.
13. **Sharkey A.:** Cytokines and implantation. *Rev Reprod*, 1998; 3: 52-61.
14. **Wuu Y-D, Pamfer S, Becquet P, Vanderheyden I, Lee K-H, De Hertogh R.:** Tumor necrosis factor a decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biol Reprod*, 1999; 60: 479-483.
15. **Lim KJH, Odukoya OA, Ajjab RA, Li T-Ch, Weetman AP, Cooke ID.:** The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril*, 2000; 73(1): 136-142.
16. **Cheong YC, Shelton JB, Laird SM, Richmond M, Kudesia G, Li TC, Ledger WL.:** IL-1, IL-6 and TNF-

a concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. *Human Reproduction*, 2000; 17(1): 69-75 2002.

17. **Martín JC, Jasper ML, Valbuena D, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A, Simón C.:** Increased adhesion in cultured endometrial-derived cells is related to the absence of moesin expression. *Biol Reprod*, 2000; 63: 1370-1376.
18. **Damarío MA, Lesnick TG, Lessey BA, Kowalik A, Mandelin E, Seppälä M, Rosenwaks Z.:** Endometrial markers of uterine receptivity utilizing the donor oocyte model. *Human Reprod*, 2001; 16(9): 1893-1899.
19. **Chervenak JL, Illsley NP.:** Epsialin acts as an antiadhesive factor in an in vitro model of human endometrial-blastocyst attachment. *Biol Reprod*, 2000; 63: 294-300.
20. **Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernández BB, Braun DP.:** Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Human Reprod*, 2001; 16(9): 1802-1808.
21. **Galán A, O'Connor JE, Valbuena D, Herrero R, Remohí J, Pampfer S, Pellicer A, Simón C.:** The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol Reprod*, 2000; 63: 430-439.
22. **Van Acker FAA, Schouten O, Haenen GRMM, van der Vijgh WFJ, Bast A.:** Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. *FEBS Letters*, 2000; 473: 145-148.
23. **Brigelius R, Traber MG.:** Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal*, 1999; 13: 1145-1155.
24. **Takahashi K, Morikawa A, Sugiyama KT, Koide N, Mu MM, Yoshida T, Yocochi T.:** Flavonoids protect mice from two types of lethal shock induced by endotoxin. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001; 31: 29-33.
25. **Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim HP.:** Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol*, 1999; 58: 759-765.
26. **Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC.:** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 2000; 52: 673-751.
27. **Suleiman SA, Elamin AM, Zaki ZMS.:** Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl*, 1996; 17: 530-537.