



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nous mecanismes en la fisiopatologia de l'endometriosi profunda

Jordina Munrós Feliu

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

TESI DOCTORAL

**NOUS MECANISMES EN LA
FISIOPATOLOGIA DE
L'ENDOMETRIOSI PROFUNDA**

Jordina Munrós Feliu

TESI DOCTORAL

Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques

Facultat de Medicina

Programa de Doctorat “Medicina i Recerca Translacional”

**NOUS MECANISMES EN LA FISIOPATOLOGIA DE
L'ENDOMETRIOSI PROFUNDA**

Memòria presentada per

Jordina Munrós Feliu

per optar al grau de Doctora en Medicina

per la Universitat de Barcelona

Maig, 2019

Directores:

Dra. Maria Àngels Martínez Zamora

Dra. Dolors Tàssies Penella

Barcelona, a 22 de maig de 2019

Doctora MARIA ÀNGELS MARTÍNEZ ZAMORA

Especialista en Ginecologia i Obstetrícia. Servei de Ginecologia - Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia (ICGON). Hospital Clínic de Barcelona.

Profesora associada mèdica. Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Investigadora de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Doctora DOLORS TÀSSIES PENELLA

Especialista en Hematologia i Hemoterapia. Cap de Secció d'Hemostàsia. Servei d'Hemoterapia i Hemostàsia - Institut Clínic de Malalties Hematològiques i Oncològiques (ICMHO). Hospital Clínic de Barcelona.

Investigadora de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Declarem que **Jordina Munrós Feliu** ha realitzat sota la nostra supervisió els estudis presentats a la tesi "**Nous mecanismes en la fisiopatologia de l'endometriosi profunda**".

Aquesta tesi s'estructura seguint la normativa per a tesis doctorals com a compendi d'articles, per a l'obtenció del grau de **Doctora en Medicina**. Els treballs esmentats estan preparats per a ser presentats al Tribunal de tesi.

Dra. Maria Àngels Martínez Zamora

Directora de Tesi

Dra. Dolors Tàssies Penella

Codirectora de Tesi

*El que sabem és una gota d'aigua,
el que ignorem és un oceà.*

Isaac Newton

AGRAÏMENTS

Vaig començar aquest projecte fa 5 anys, i són moltes les persones que d'una manera o altra han contribuït a la consecució d'aquesta tesi doctoral. De totes me n'emporto un aprenentatge, ja sigui a nivell professional o personal, que ha fet que ara sigui qui sóc. És per això que a totes vosaltres, moltes gràcies.

Tot i així, voldria agrair d'una forma molt especial a aquelles persones que m'han ajudat en aquest camí i que sense elles, l'elaboració d'aquesta tesi no hagués estat possible. En primer lloc, vull donar les gràcies a les meves directores de tesi, la Maria Àngels i la Dolors, per tot el suport donat des de l'inici del projecte, quan vam començar a elaborar el que inicialment era el "Premi Fi de Residència", i que ha acabat esdevenint aquesta tesi doctoral. He après molt de vosaltres, m'heu transmès la curiositat i la il·lusió per la investigació, però també el rigor científic i la perseverança que es requereix, i que estic segura que m'acompanyarà al llarg de la meva vida professional. Gràcies Dolors per donar-me l'oportunitat de fer d'"ocupa" al vostre Laboratori d'Hemostàsia, per transmetre'm la inquietud per explorar nous paràmetres (sense tu els NETs no haurien estat possibles!) i per la teva visió crítica en revisar els resultats, els esborranys dels articles i la memòria d'aquesta tesi. He de reconèixer que he descobert la importància de l'hemostàsia en la medicina, un món per mi prou desconegut fins que no vaig començar aquest projecte. Gràcies Maria Àngels, en aquests anys no has estat només la meva tutora de residència i la meva directora de tesi, sinó que, amb totes les converses i reflexions mantingudes, i tots els moments compartits, has esdevingut una amiga. Gràcies per la teva insistència en la feina ben feta, per totes les teves correccions i observacions en el disseny i l'elaboració del projecte i dels articles que han permès que avui presenti aquesta tesi doctoral. Gràcies per creure en mi i per ensenyar-me tant de la ginecologia, de la recerca i de la vida.

Gràcies també a tots els altres coautors dels articles que componen la tesi doctoral, especialment al Dr. Carmona, per haver-me brindat l'oportunitat de desenvolupar aquest projecte de recerca amb el seu equip i adquirir així molts coneixements en el camp de la ginecologia i de l'endometriosis i per haver comptat

amb la meva participació en el projecte Lumenis que ha permès l'elaboració d'un dels articles que componen aquesta tesi doctoral. Vull agrair també al Prof. Balasch i al Dr. Reverter haver cregut en aquest projecte quan encara era quasi un esborrany i oferir-nos, des de la seva llarga experiència en la recerca científica, el seu punt de vista crític en el disseny i l'elaboració dels articles que componen aquesta tesi. I finalment, vull donar les gràcies a la Lúdia, per totes les hores dedicades al laboratori, i a l'Amèlia per totes les extraccions realitzades.

Gràcies també, a totes aquelles pacients que han donat el seu consentiment a participar en el projecte i han permès que el pogués dur a terme. Espero amb aquesta tesi haver aportat una mica de llum a aquesta patologia tan complexa i tan desconeguda.

Gràcies a tots els companys i companyes del Clínic i de la Mater, de tots he après molt, sobretot l'esforç i la il·lusió per la feina ben feta i el rigor professional que m'heu inculcat des del primer moment i que m'acompanyarà tota la vida.

Gràcies també a les meves amigues, que heu estat al meu costat en tot moment. A aquella pregunta que últimament sempre em fèieu quan em vèieu... com va la tesi? Ja us puc dir que finalment l'he acabada. Alba, siguis on siguis, et portaré sempre al meu cor.

Gràcies també a tu, Josep, per fer que cada dia al teu costat sigui una aventura.

I finalment, gràcies pares. Gràcies pel vostre suport incondicional, i per donar-me forces quan les he necessitat. M'heu transmès valors sense els quals no hagués arribat on sóc ara. Sóc qui sóc sobretot gràcies a vosaltres. I gràcies també a tu, iaia, per cuidar-me sempre.

PRESENTACIÓ

La present tesi doctoral està estructurada seguint la normativa per a tesis doctorals com a compendi d'articles, per a l'obtenció del grau de Doctor en Medicina, aprovada per la *Comissió de Doctorat de la Facultat de Medicina* el 16 de març de 2012 amb darrera modificació el 4 de maig de 2018.

Els estudis inclosos en aquesta tesi doctoral pertanyen a una mateixa línia de recerca. Els resultats obtinguts gràcies a aquests estudis han aportat informació rellevant i innovadora sobre el tema i han estat recollits en 4 articles originals, publicats en revistes d'àmplia difusió internacional.

Publicacions internacionals incloses en la tesi doctoral

1. ***Total circulating microparticle levels are increased in patients with deep infiltrating endometriosis***

Munrós J, Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Coloma JL, Torrente MA, Reverter JC, Carmona F, Balasch J.

Hum Reprod. 2017 Feb;32(2):325-331.

doi: 10.1093/humrep/dew319. Epub 2016 Dec 17.

Factor d'impacte: 4.990

1r quartil (Obstetrícia i Ginecologia)

2. ***Increased circulating cell-derived microparticle levels in deep infiltrating endometriosis patients with larger implants***

Munrós J, Tàssies D, Reverter JC, Carmona F, Martínez-Zamora MA.

J Endometr Pelvic Pain Disord. In press.

3. ***Circulating neutrophil extracellular traps are elevated in patients with deep infiltrating endometriosis***

Munrós J, Tàssies D, Reverter JC, Martin L, Pérez A, Carmona F, Martínez-Zamora MA.

Reprod Sci. 2019 Jan;26(1):70-76.

doi: 10.1177/1933719118757682. Epub 2018 Feb 15.

Factor d'impacte: 2.548

2n quartil (Obstetrícia i Ginecologia)

4. ***Total circulating microparticle levels after laparoscopic surgical treatment for endometrioma: a pilot, prospective, randomized study comparing stripping with CO₂ laser vaporization***

Munrós J, Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Reverter JC, Rius M, Gracia M, Ros C, Carmona F.

J Minim Invasive Gynecol. 2019 Mar-Apr;26(3):450-455.

doi: 10.1016/j.jmig.2018.05.014. Epub 2018 May 24.

Factor d'impacte: 3.061

2n quartil (Obstetrícia i Ginecologia)

Premis i beques del treball d'investigació

1. Premi Fi de Residència "Emili Letang" concedit per l'Hospital Clínic de Barcelona l'any 2015 al projecte de recerca: "Investigación del papel de las micropartículas circulantes y el factor tisular en la fisiopatología de la endometriosis y su utilidad como posible biomarcador de actividad".
2. Beca FIS-PI 11/00977 del Plan Nacional de I+D+D (Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER).
3. Beca FIS-PI 11/01560 del Plan Nacional de I+D+D (Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER).
4. Premi al millor pòster per a la comunicació presentada al 2n Congrés de la *Society of Endometriosis and Uterine Disorders* (SEUD) celebrat a Barcelona del 12 al 14 de maig del 2016: "*Microparticle levels after ovarian cystectomy versus laser vaporization in the laparoscopic treatment of ovarian endometriomas. Results of a preliminary trial*".

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	23
1.1. Definició, epidemiologia i importància de l'endometriosi	25
1.2. Classificació de l'endometriosi	28
1.3. Eines diagnòstiques i estadificació de l'endometriosi	29
1.3.1. Eines diagnòstiques	29
1.3.2. Estadificació de l'endometriosi	31
1.4. Tractament mèdic i quirúrgic de l'endometriosi	35
1.4.1. Tractament mèdic de l'endometriosi	35
1.4.2. Tractament quirúrgic de l'endometriosi	37
1.5. Fisiopatologia de l'endometriosi	40
1.5.1. Teories de l'origen de l'endometriosi	41
1.5.2. Mecanismes fisiopatològics de l'endometriosi	42
1.6. L'endometriosi com a patologia inflamatòria	43
1.6.1. L'endometriosi com a patologia inflamatòria sistèmica i l'endometriosi profunda com a fenotip diferenciat	43
1.6.2. La relació entre inflamació i hemostàsia en l'endometriosi	44
1.6.3. Les micropartícules circulants i el factor tissular en l'endometriosi	47
1.6.4. Els <i>neutrophil extracellular traps</i> (NETs) en l'endometriosi	50
1.7. Rellevància i justificació de l'estudi	52
2. HIPÒTESI DE TREBALL	55
2.1. Hipòtesi principal	57
2.2. Hipòtesis específiques	57
3. OBJECTIUS	59
3.1. Objectius principals	61
3.2. Objectius específics	61

4. INVESTIGACIONS REALITZADES, MATERIALS I MÈTODES I RESULTATS	63
4.1. Estudi 1: <i>Total circulating microparticle levels are increased in patients with deep infiltrating endometriosis</i>	67
4.2. Estudi 2: <i>Increased circulating cell-derived microparticle levels in deep infiltrating endometriosis patients with larger implants</i>	77
4.3. Estudi 3: <i>Circulating neutrophil extracellular traps are elevated in patients with deep infiltrating endometriosis</i>	89
4.4. Estudi 4: <i>Total circulating microparticle levels after laparoscopic surgical treatment for endometrioma: a pilot, prospective, randomized study comparing stripping with CO₂ laser vaporization</i>	99
5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ	107
6. CONCLUSIONS I IMPLICACIONS CLÍNiques	129
7. BIBLIOGRAFIA	135

ABREVIATURES UTILITZADES EN AQUESTA TESI DOCTORAL

ADN: Àcid desoxiribonucleic

rASRM: *Revised American Society of Reproductive Medicine*

cMP: *Circulating cell-derived microparticles* (micropartícules circulants)

cMP-TF: *Circulating tissue factor-containing microparticles* (micropartícules circulants portadores de factor tissular)

COX: Ciclooxygenasa

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EO: Endometriosi ovàrica o endometrioma

EP: Endometriosi profunda

ESP: Endometriosi superficial peritoneal

EVA: Escala visual analògica

TF: *Tissue factor* (Factor tissular)

GnRH: *Gonadotropin-releasing hormone*

IL: Interleuquina

IMC: Índex de massa corporal

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*

MMP: *Matrix metalloproteinase*

MPO: Mieloperoxidasa

NETs: *Neutrophil extracellular traps*

NK: *Natural killer*

PAR: *Protease activated receptor*

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein ligand-1*

RM: Ressonància magnètica

sTF: *Soluble tissue factor* (factor tissular soluble)

TNF- α : *Tumor necrosis factor-alpha*

TGF- β : *Transforming growth factor-beta*

TV: Transvaginal

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

1. INTRODUCCIÓ

1.1. DEFINICIÓ, EPIDEMIOLOGIA I IMPORTÀNCIA DE L'ENDOMETRIOSI

L'endometriosi (E) és una malaltia ginecològica benigna crònica que es defineix com la presència de teixit endometrial (glàndules i estroma) fora de la cavitat uterina, essent la localització més habitual, tot i que no exclusiva, la corresponent a les estructures del compartiment pelvià (ovaris, fons de sac de Douglas, recte, recte-sigma, envà rectovaginal, lligaments uterosacres, vagina, bufeta urinària i peritoneu pelvià) (Giudice and Kao, 2004; Vercellini et al., 2014). Es tracta d'una patologia inflamatòria estrogen-dependent que afecta a dones en edat reproductiva i s'associa essencialment a àlgies pelvianes, sagnat uterí anormal i/o esterilitat (Burney and Giudice, 2012).

En termes generals, afecta a un 5-10% de la població femenina en edat fèrtil i, entre les dones amb àlgies pelvianes i/o esterilitat, la prevalença s'estima en un 35-50% (Giudice and Kao, 2004). Tot i això, l'estimació exacta de la prevalença i la incidència és molt difícil ja que en ocasions el retard del diagnòstic des de l'inici de la simptomatologia pot arribar a ser de fins a 10 anys. Aquest retard es pot explicar per la inespecificitat i normalització a nivell social dels símptomes referits per les pacients i la dificultat en el diagnòstic de certesa, perquè encara que actualment les proves d'imatge han esdevingut eines diagnòstiques de precisió, fins ara la cirurgia era considerada el *gold standard* (Giudice and Kao, 2004; Burney and Giudice, 2012; Vercellini et al., 2014). Més enllà de les dificultats diagnòstiques, hi ha certa controvèrsia entre la comunitat científica sobre la definició exacta d'E, ja que la presència de teixit endometrial ectòpic, és a dir, fora de la cavitat uterina, podria no ser considerada sempre una situació patològica segons alguns experts, sinó que podria tractar-se d'un fenomen histològic temporal. El consens general és que l'E, com a malaltia, es consideraria en cas de presència de símptomes o progressió de la lesió histològica que requereix un estudi i valoració de la pacient (Vercellini et al., 2014).

Els símptomes principals que caracteritzen la malaltia són les àlgies pelvianes en forma de dismenorrea, dispareunia, àlgies pelvianes cròniques, periovulatòries o intermenstruals, disquèzia i disúria, i el sagnat uterí anormal, generalment en forma d'hipermenorrea. Segons l'afectació anatòmica, les pacients poden presentar també hematúria o rectorràgies. Tot i que la localització habitual del teixit endometrial ectòpic és al compartiment pelvià, l'E pot localitzar-se a altres estructures

anatòmiques com la pleura, el pericardi, les cicatrius d'intervencions quirúrgiques prèvies o, fins i tot, el cervell, amb els símptomes i signes propis de d'aquestes localitzacions (pneumotòrax catamenial, sagnat i/o àlgies a la zona de la cicatriu,...). De tot això es pot deduir que l'E representa una condició limitant per a la qualitat de vida de les pacients que la pateixen (Giudice and Kao, 2004; Burney and Giudice, 2012; Vercellini et al., 2014).

Per altra banda les pacients amb E solen presentar un major fracàs reproductiu; de fet, la prevalença de pacients amb E i esterilitat és de fins al 50% (Giudice and Kao, 2004). A més, en relació als resultats en cas de tècniques de reproducció assistida, la presència d'E sembla afectar negativament a la qualitat i el nombre d'òcits obtinguts i a les probabilitats de fertilització i d'implantació embrionària (Harb et al., 2013; Barbosa et al., 2014; Hamdan et al., 2015). De la mateixa manera, s'han realitzat múltiples revisions i metaanàlisis sobre la relació entre l'E i els mals resultats obstètrics, amb conclusions discordants sobre el risc d'avortaments espontanis, de preeclàmpsia, de retard de creixement intrauterí i el nombre de recent nascuts vius. Tot i això, sí que sembla haver-hi certa evidència sobre la relació entre la presència d'E i les placentacions anòmales (placenta prèvia), el risc de part prematur i el nombre de cesàries. A més, s'han descrit complicacions obstètriques com perforacions intestinals, hemoperitonis espontanis i quists ovàrics complicats, tot i que aquestes són poc freqüents i d'aparició imprevisible, però que cal tenir en compte al llarg del seguiment de l'embaràs d'aquestes pacients per tal de fer-ne un maneig terapèutic òptim (Brosens et al., 2012; Falconer, 2013; Mekarú et al., 2014; Viganò et al., 2015; Leone Roberti Maggiori et al., 2016; Berlac et al., 2017; Zullo et al., 2017).

En referència al tractament de la malaltia, fins fa pocs anys la cirurgia (conservadora o radical) era el tractament d'elecció en cas de pacients simptomàtiques. Però, malgrat que inicialment la cirurgia podria donar lloc a una milloria en l'evolució de les pacients, múltiples estudis han descrit recurrències freqüents en cas de cirurgies conservadores, pel que la majoria de les pacients requereixen més d'una cirurgia al llarg de la seva vida fèrtil, amb les seqüeles que aquestes poden ocasionar, com ara l'afectació de la reserva ovàrica, la presència d'adherències postquirúrgiques i el risc de lesions del tracte intestinal o urinari (Guo, 2009; Vercellini et al., 2014). Pel que fa al tractament mèdic, s'ha descrit la utilització d'anticonceptius hormonal combinats, progestàgens, agonistes de la GnRH i

antiinflamatoris no esteroïdals (Vercellini et al., 2014), tots ells amb una eficàcia limitada i efectes secundaris rellevants a tenir en compte en el seguiment a llarg termini d'aquestes pacients (Giudice and Kao, 2004).

De tot això es pot concloure que l'E representa una patologia amb important afectació de la qualitat de vida de pacients en edat jove i una càrrega sociosanitària significativa, per la qual no es disposa d'eines diagnòstiques ni terapèutiques definitives per tal de poder oferir un maneig òptim a les pacients afectades. De fet s'estima que el cost sanitari d'una dona amb E pot arribar a ser un 63% més elevat que el d'una dona de la mateixa edat sana (Vercellini et al., 2014). Però més enllà dels costos sanitaris, no s'han d'infraestimar les repercussions que aquesta patologia, en ocasions desconeguda, suposa a nivell personal, social i professional per a les pacients que la pateixen.

L'E es va descriure per primera vegada el 1860 (Vercellini et al., 2014) i, tot i la seva elevada prevalença i la important càrrega sociosanitària que representa, l'etiologia i fisiopatologia segueixen essent, ara per ara, en part desconegudes. La teoria de Sampson (Sampson, 1922; Sampson, 1927) és la més coneguda i proposa que aquesta patologia té el seu origen en la menstruació retrògrada del teixit endometrial a través de les trompes de Fal·lopi cap a la cavitat peritoneal. S'han descrit, però, altres teories, com la metaplàsia celòmica o la disseminació de teixit endometrial via hematògena o limfàtica, entre d'altres. Però més enllà d'aquestes teories, en la fisiopatologia de l'E s'ha descrit la intervenció de diversos processos biològics en la implantació i el desenvolupament del teixit endometrial en localitzacions ectòpiques, i que permetrien l'evasió d'aquestes cèl·lules del sistema immunitari, la invasió de l'epiteli peritoneal, la neuroangiogènesi i l'aparició de neovascularització a les localitzacions afectades així com el creixement i supervivència d'aquest teixit. Múltiples investigacions realitzades al llarg d'aquesta última dècada han demostrat que en la fisiopatologia d'aquesta condició ginecològica hi intervenen mecanismes moleculars relacionats amb la dependència estrogènica, la resistència als progestàgens i la resposta inflamatòria (Bulun, 2009; Burney and Giudice, 2012; Reis et al., 2012; Vercellini et al., 2014).

Aquest fet és de gran rellevància ja que la millor comprensió dels mecanismes fisiopatològics que intervenen en l'aparició i progressió de l'E ajudarà a la comunitat científica al desenvolupament de noves eines diagnòstiques i terapèutiques de major eficàcia per al maneig d'aquesta malaltia que, per la seva banda, pot arribar a ser, en

ocasions, un factor condicionant molt important per a la qualitat de vida de les pacients que la pateixen.

1.2. CLASSIFICACIÓ DE L'ENDOMETRIOSI

L'E és una patologia ginecològica que es defineix per la presència de teixit endometrial (glàndules i estroma) fora de la cavitat uterina. En funció de la localització del teixit endometrial ectòpic i el grau de penetració de la superfície peritoneal, s'han descrit tres formes clíniques d'aquesta patologia (Koninckx and Martin, 1992; Nisolle and Donnez, 1997; Vercellini et al., 2004; Bulun, 2009; Tosti et al., 2015; Gordts et al., 2017):

- **Endometriosi superficial peritoneal (ESP):** es refereix als implants de teixit endometrial ectòpic que es localitzen a la superfície peritoneal.
- **Endometriosi ovàrica o endometrioma (EO):** es refereix a la presència de quists ovàrics revestits de teixit endometrial.
- **Endometriosi profunda (EP):** es refereix als implants de teixit endometrial ectòpic que penetren més de 5 mm sota la superfície peritoneal (Koninckx and Martin, 1992; Gordts et al., 2017). Aquesta forma ha estat descrita com la més agressiva de la malaltia, amb una major gravetat de l'afectació clínica i un maneig terapèutic més difícil (Tosti et al., 2015).

De fet, avui en dia és font de controvèrsia si les tres formes clíniques descrites comparteixen la mateixa fisiopatologia o l'EP podria presentar mecanismes patogènics distintius que la diferenciarien de les altres dues formes i n'explicarien la major gravetat clínica i dificultat terapèutica (Tosti et al., 2015; Donnez, 2017; Gordts et al., 2017).

Una entitat ginecològica que cal mencionar també és l'adenomiosi, definida com la invasió del miometri per glàndules i/o estroma endometrial més enllà de 5 mm de la unió miometrial-endometrial (Gordts et al., 2018). L'adenomiosi és causa de dismenorrea, àlgies pelvianes, esterilitat i sagnats uterins anormals. La seva prevalença, que s'estima entre el 5 i el 70%, és en part incerta ja que el *gold standard*

per al diagnòstic és l'estudi histopatològic, tot i que actualment amb la milloria de les proves d'imatge (ecografia ginecològica transvaginal (TV) i ressonància magnètica (RM)) s'ha incrementat la detecció d'aquesta patologia. Malgrat que la seva fisiopatologia és avui en dia encara desconeguda, per la seva similitud a nivell histològic i clínic amb l'E, hi ha certa discussió a la comunitat científica sobre si es tracta d'una entitat independent o seria una forma clínica més de l'E (Van den Bosch et al., 2015; Gordts et al., 2018).

1.3. EINES DIAGNÒSTIQUES I ESTADIFICACIÓ DE L'ENDOMETRIOSI

1.3.1. Eines diagnòstiques

Fins fa poc el *gold standard* per al diagnòstic de l'E era l'estudi histològic de les lesions, pel que era condició indispensable la cirurgia, laparoscòpica preferentment, per a l'avaluació de la pelvis i l'obtenció de teixit endometriòsic per a la seva valoració anatomopatològica i confirmació diagnòstica. Tot i així, en els últims anys s'ha demostrat que aquesta patologia pot ser diagnosticada sense haver de recórrer a la cirurgia ni a l'estudi histològic en cas de la presència de símptomes i signes propis de la malaltia i troballes altament suggestives d'E a les proves d'imatge, en especial l'ecografia ginecològica TV i la RM de la pelvis. Tot i que algun tipus d'adherències, en especial les laxes, i els implants d'ESP requereixen l'exploració de la cavitat abdominal per ser diagnosticats, els EO i els implants d'EP poden ser identificats mitjançant proves d'imatge amb una elevada precisió (Vercellini et al., 2014; Guerriero et al., 2016; Bazot and Daraï, 2017). De fet, s'ha descrit una sensibilitat i especificitat del 79% i 94%, respectivament, per al diagnòstic de l'EP en cas de l'ecografia TV; i del 94% i 77%, respectivament, mitjançant la RM. I, segons alguns autors, la combinació de l'ecografia ginecològica TV i la RM presentarien una precisió de fins al 95% en cas de la detecció d'EP a nivell de recte-sigma (Bazot and Daraï, 2017). És per aquest motiu que alguns autors consideren que avui en dia caldria replantejar la laparoscòpia i l'estudi histològic com a *gold standard* en el diagnòstic de l'E (Bazot and Daraï, 2017). Tot i així, cal especificar que es requereix de cert grau

d'experiència i entrenament per tal d'assolir aquests nivells de precisió diagnòstica (Dunselman et al., 2014; Guerriero et al., 2016).

L'ús de les proves d'imatge no només serviria per al diagnòstic de la malaltia (en cas d'una anamnesi i exploració física altament suggestives) i l'exclusió d'altres patologies causants de dolor pelvià, sinó també per a la planificació del maneig multidisciplinar de la pacient amb E i la descripció acurada de la localització de les lesions prèviament al tractament quirúrgic, si la pacient finalment ho requerís (Guerriero et al., 2016; Bazot and Daraï, 2017). Per tant, tenint en compte l'elevada capacitat de detecció d'EO i EP que presenten les proves d'imatge, avui en dia es pot considerar l'ecografia TV com a eina diagnòstica de primera línia en cas de sospita d'E tant pel seu fàcil accés com pel seu cost, i la RM en segon lloc, ja que ofereix avantatges diagnòstics en comparació amb l'ecografia TV en la valoració global de la pelvis i la vagina (Exacoustos, 2014).

També s'ha plantejat com a opció prèvia a la cirurgia per al diagnòstic de l'E, l'inici de tractament hormonal empíric (Dunselman et al., 2014; Vercellini et al., 2014). Com a tractament hormonal s'ha descrit l'ús d'anticonceptius hormonals combinats, els progestàgens i antiprogestàgens, els agonistes i antagonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropina o *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) i els inhibidors de l'aromatasa (Dunselman et al., 2014). Generalment s'utilitzen els anticonceptius hormonals o els agonistes de la GnRH (Dunselman et al., 2014, Vercellini et al., 2014). Tot i així, la resposta favorable al tractament hormonal no sempre implica la presència d'E sinó que únicament és sinònim de dolor pelvià hormonalment dependent, però sí que és cert que la manca de resposta al tractament empíric reduirà les possibilitats diagnòstiques de l'E com a origen de la simptomatologia (Vercellini et al., 2014). S'ha de tenir en compte, a més, que donada la facilitat per a la prescripció d'anticonceptius hormonals, especialment en la població adolescent i/o jove, cal tenir present que la dismenorrea primària podria ser indicativa d'E al llarg de la vida, pel que s'hauria considerar aquest fet pel que fa al risc de retard en el diagnòstic en aquest grup de pacients i advertir-los-en (Dunselman et al., 2014). Per tant, la prescripció de tractament hormonal és recomanable com a tractament empíric i eina diagnòstica en casos dubtosos, prèvia a la cirurgia laparoscòpica.

1.3.2. Estadificació de l'endometriosi

L'estadificació de l'E és font de controvèrsia a conseqüència de la gran diversitat de manifestacions clíniques de la malaltia. De fet, fins al moment, les diverses classificacions existents s'han focalitzat únicament en l'extensió quirúrgica de la malaltia i, més recentment, amb la intenció d'atribuir-los un valor pronòstic.

L'estadificació més coneguda és l'anomenada *revised American Society for Reproductive Medicine (rASRM) classification* (ASRM, 1997). Tot i així, altres sistemes d'estadificació han sorgit en les últims anys, com són la classificació *Enzian* per a l'EP (Tuttles et al., 2005; Haas et al., 2013), l'*Endometriosis Fertility Index (EFI)* (Adamson and Pasta, 2010) i la classificació de l'*American Association of Gynecological Laparoscopists (AAGL)* (Johnson et al., 2017; <http://www.aagl.org/wp-content/uploads/2013/03/NewsScope-Oct-Dec-2012.pdf>, encara no publicada a data d'avui). Tot i així, els sistemes d'estadificació actuals són font de crítiques per part dels clínics i les dones que pateixen la malaltia, ja que presenten una correlació molt pobre amb la simptomatologia i també manquen de fiabilitat per a la presa de decisions sobre el maneig d'aquestes pacients (Johnson et al., 2017). Per tant, l'objectiu de l'estadificació de l'E seria oferir al clínic una eina per al maneig dels símptomes relacionats amb la malaltia i amb valor pronòstic sobre la resposta als tractaments i l'aparició de recurrències (Johnson et al., 2017).

Segons el consens en l'estadificació de l'E de la *World Endometriosis Society* (Johnson et al., 2017), es recomana, fins a l'aparició de millors sistemes de classificació, i amb la finalitat de maximitzar la informació a les pacients posteriorment a la cirurgia, l'ús de l'estadificació quirúrgica segons la rASRM en totes les dones sotmeses a tractament quirúrgic i, en cas de la presència d'EP, s'hauria de completar addicionalment la classificació *Enzian*. Per les que presentin desig genètic futur caldria utilitzar, a més, la classificació EFI ja que té com a objectiu predir els resultats reproductius en pacients amb E.

En el nostre cas, ens centrarem en la classificació rASRM i l'*Enzian* per a l'estadificació de l'E, que són les que s'han utilitzat per a la descripció i classificació de les pacients incloses en els articles que formen part de la present tesi doctoral.

La **classificació rASRM** (Figura 1a) estadifica l'E en 4 categories segons la puntuació obtinguda en funció de la presència i mida dels implants d'E a nivell peritoneal, la presència i mida d'EO, la presència d'obliteració parcial o completa del fons de sac de Douglas i la presència d'adherències laxes o fermes a nivell d'ovaris i/o trompes. Les categories obtingudes segons la puntuació són: mínima (estadi I), lleu (estadi II), moderada (estadi III) o greu (estadi IV). Tot i que és el sistema d'estadificació més utilitzat, convé destacar que aquesta classificació no té en compte lesions d'EP de rellevància clínica ni l'afectació a nivell retroperitoneal, i no presenta correlació amb la freqüència i gravetat de la simptomatologia ni amb els resultats reproductius de les pacients.

La **classificació Enzian** (Figura 1b) divideix les estructures afectades per EP a nivell retroperitoneal en els següents compartiments:

- Compartiment A: envà rectovaginal i vagina
- Compartiment B: lligaments uterosacs fins a paret pelviana
- Compartiment C: recte i sigma

De la mateixa manera, la gravetat de les lesions es classifica en 3 graus en funció de la profunditat d'invasió dels teixits:

- Grau 1: invasió <1 cm
- Grau 2: invasió 1-3 cm
- Grau 3: invasió >3 cm

Les lesions localitzades fora de la pelvis menor i altres òrgans es classifiquen segons l'*Enzian* amb el prefix "F" de *foreign* o *far* ("llunyà" en anglès) ja que es refereix a localitzacions allunyades de les estructures retroperitoneals: FA = adenomiosi, FB = afectació de la bufeta, FU = afectació ureteral, FI = afectació intestinal (a nivell cranial de la unió rectosigmoïdal), FO = altres (*other* en anglès) localitzacions.

S'utilitza una nomenclatura similar a l'estadificació TNM per als processos oncològics i només es té en compte l'implant d'E de major mida a cada compartiment afectat (en cas que hi hagi més d'una lesió a un mateix compartiment). Aquesta classificació ofereix una millor precisió en la descripció de la localització i extensió de l'EP que afecta estructures de localització retroperitoneal comparat amb la rASRM. Tot i això, la seva aplicació clínica és més complicada que la rASRM, pel que no s'ha estès a nivell internacional. A més, presenta una major dificultat de comprensió per part de les pacients i no hi ha dades de la seva correlació amb la simptomatologia.

Figura 1a. Sistema de classificació de l'endometriosi segons la rASRM (ASRM, 1997; Johnson et al., 2017)

REVISED AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS 1985

Patient's Name _____ Date: _____

Stage I (Minimal) 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Stage II (Mild) 6-15 Recommended Treatment _____
 Stage III (Moderate) 16-40 _____
 Stage IV (Severe) >40 _____
 Total _____ Prognosis _____

ENDOMETRIOSIS		< 1 cm	1 – 3 cm	> 3 cm
Peritoneum	Superficial	1	2	4
	Deep	2	4	6
Ovary	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial 4		Complete 40
ADHESIONS		< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
Ovary	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
Tube	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16

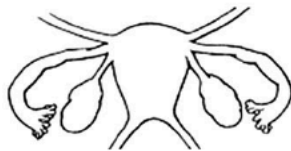
*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Additional Endometriosis: _____

Associated Pathology: _____

To Be Used with Normal
Tubes and Ovaries

L R

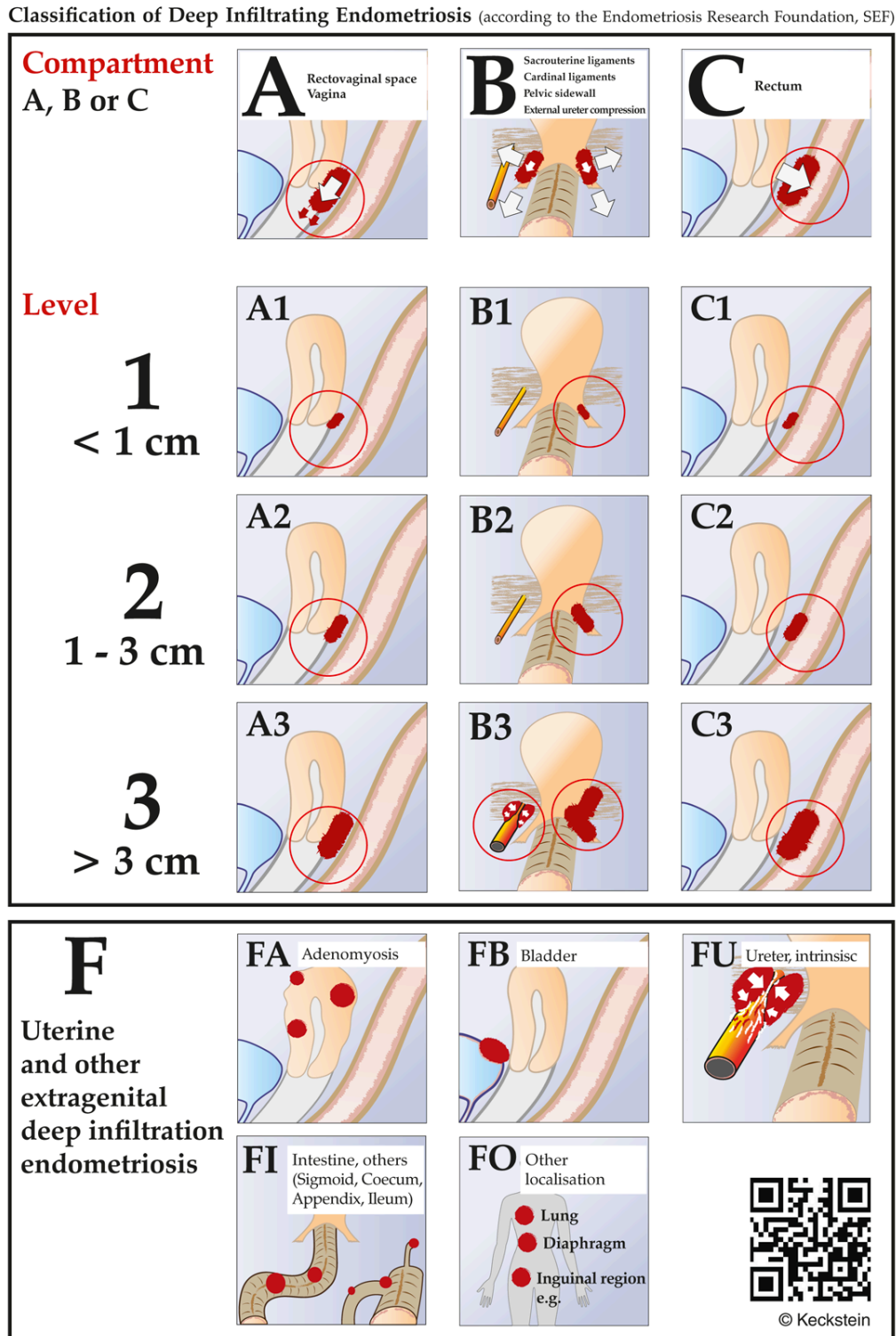


To Be Used with Abnormal
Tubes and/or Ovaries

L R



Figura 1b. Sistema *Enzian* de classificació de l'endometriosi profunda (Tuttles et al., 2005; Haas et al., 2013; Johnson et al., 2017)



1.4. TRACTAMENT MÈDIC I QUIRÚRGIC DE L'ENDOMETRIOSI

El tractament de l'E en pacients simptomàtiques té com a objectius la reducció del dolor, la milloria de la fertilitat, en cas necessari, i la disminució de les recurrències (Donnez et al., 2004; Vercellini et al., 2014). L'elecció entre el tractament mèdic o el quirúrgic dependrà de diversos factors, com ara la localització i mida dels implants, el compromís d'estructures a nivell intestinal i ureteral, la mida dels EO i les seves característiques a les proves d'imatge i també el desig genèsic de les pacients (Dunselman et al., 2014; Vercellini et al., 2014). Donat que la cirurgia conservadora de la fertilitat sovint presenta una reducció únicament parcial de la simptomatologia i les recurrències no són menyspreables, avui en dia el tractament mèdic cal considerar-lo com una alternativa o un complement al tractament quirúrgic. Pel que fa a les pacients asimptomàtiques amb troballa incidental d'E tant a les proves d'imatge com en el context d'una cirurgia, no s'han realitzat estudis sobre el benefici del tractament quirúrgic de l'E i, tot i que la seva evolució natural és incerta, s'estima que les probabilitats d'esdevenir simptomàtica són mínimes (Moen and Stokstad, 2002), pel que actualment no es considera com a primera opció la quirúrgica tenint en compte els riscos que aquesta comporta.

1.4.1. Tractament mèdic de l'endometriosi

El tractament mèdic de l'E té com a objectius la inhibició de l'ovulació, la supressió de la menstruació i l'assoliment d'un ambient hormonal estable. Amb l'administració dels fàrmacs hormonaus d'ús en l'E, a més, s'assoleix un ambient hipoestrogènic (en cas dels agonistes de la GnRH), hiperandrogènic (danazol, gestrinona) o hiperprogestogènic (anticonceptius hormonaus combinats, progestàgens) amb el que s'aconsegueix, alhora, la supressió de la proliferació cel·lular endometrial. Aquests efectes, però, són transitoris i no tenen efecte citoreductor, pel que les lesions d'E reiniciaran la seva activitat metabòlica i proliferativa en suspendre el tractament mèdic, amb el risc de progressió de la malaltia i reaparició de la simptomatologia. Per aquest motiu, el tractament mèdic en el cas de pacients amb E s'ha de plantejar a llarg termini, com ho requereixen altres patologies cròniques (Vercellini et al., 2014). Pel que fa a la diversitat de tractaments

hormonals que hi ha actualment, l'evidència científica ha demostrat que, si s'assoleix un estat amenorreic, no hi ha diferències massa significatives entre els diversos fàrmacs en termes de milloria del dolor, tot i que sí que n'hi ha en termes de tolerància, efectes adversos i costos econòmics. Per tant, cal tenir en compte que, per tal de millorar l'adherència de les pacients al tractament hormonal indicat, que es preveu que serà a llarg termini, s'utilitzaran fàrmacs amb el millor perfil de seguretat, tolerància i cost econòmic i sempre amb les mínimes dosis eficaces (Vercellini et al., 2011).

Entre els fàrmacs que s'han descrit per al tractament de l'E hi ha els anticonceptius hormonals combinats, progestàgens, agonistes i antagonistes de la GnRH, antagonistes de la progesterona, inhibidors de l'aromatasa, agents antiangiogènics, antioxidants, inhibidors de la ciclooxygenasa (COX)-2, immunomoduladors, inhibidors de cinases i metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular o *matrix metalloproteinases* (MMP), moduladors selectius dels receptors d'estrògens i progestàgens, i estatines, entre d'altres. De tots ells, els que avui en dia són d'ús clínic per al tractament de l'E són els anticonceptius hormonals combinats, els progestàgens, els anti-progestàgens, els agonistes i antagonistes de la GnRH i els inhibidors de l'aromatasa (Dunselman et al., 2014). D'aquests, els que han demostrat un major benefici per a la majoria de pacients simptomàtiques són els dos primers, a més de ser accessibles, generalment ben tolerats i amb un cost relativament baix. Aproximadament en dos terços de les pacients tractades amb anticonceptius hormonals combinats o progestàgens s'assoliran els objectius que s'esperen amb el tractament mèdic de l'E: la milloria del dolor a llarg termini i la prevenció de la progressió de la malaltia (Vercellini et al., 2011). Malgrat tot, algunes pacients no presentaran milloria pel que fa al dolor, interrompran el tractament per intolerància o requeriran ser sotmeses a tractament quirúrgic. La resta de fàrmacs esmentats han estat objecte de diversos assajos clínics i, malauradament, cap d'ells ha pogut demostrar una evidència ferma pel que fa a la seguretat i l'eficàcia. Per aquest motiu, actualment, l'objectiu del tractament mèdic de l'E es limita a la supressió de l'activitat endometrial mitjançant la manipulació hormonal, ja que cap fàrmac ha demostrat, ara per ara, un efecte citoreductor del teixit endometriòsic. Per tant, podem afirmar que, avui en dia, l'eliminació del teixit ectòpic endometrial no és possible farmacològicament, pel que no hi ha cap fàrmac que ens permeti el tractament definitiu de l'E. I és per aquest motiu que cal una millor comprensió dels

mecanismes fisiopatològics de l'E per tal de poder desenvolupar, en un futur, fàrmacs que finalment siguin capaços d'erradicar la malaltia de forma definitiva i que presentin un bon perfil de seguretat i tolerància per a les pacients.

1.4.2. Tractament quirúrgic de l'endometriosi

El tractament quirúrgic de l'E dependrà entre d'altres, de la simptomatologia que refereixi la pacient, la resposta al tractament hormonal si és que s'ha iniciat, el compromís d'estructures com les vies urinàries o el tracte gastrointestinal, la presència d'EO, la seva mida i característiques, l'edat i el desig genèsic de la pacient.

La cirurgia laparoscòpica és considerada d'elecció en l'E ja que, tot i que tant la laparotomia com la laparoscòpia semblen igual d'efectives en el tractament del dolor associat a la malaltia, la via laparoscòpica s'associa a una reducció del dolor postoperatori, menor temps d'ingrés hospitalari i millor recuperació i resultats estètics (Dunselman et al., 2014). Tot i així, cal tenir en compte la presència, cada cop més estesa, de la cirurgia robòtica, la qual cal considerar-la com una alternativa a la cirurgia laparoscòpica.

La cirurgia de l'E pot ser radical o conservadora de la fertilitat. Això dependrà, bàsicament, del desig genèsic de la pacient. En el primer cas, si la pacient no presenta desig genèsic o ja l'ha complert, la cirurgia radical o definitiva inclourà la resecció dels implants d'E, la histerectomia i la salpingectomia bilateral. Aquesta opció ha demostrat ser efectiva en termes de reducció de la dismenorrea i pot millorar significativament la dispareunia profunda. Tot i així, la preservació dels ovaris pot predisposar a la persistència d'àlgies pelvianes degut a la producció hormonal. És per aquest motiu que en ocasions, s'ha considerat fins i tot la doble annexectomia en pacients que no han presentat resposta a tractaments més conservadors, tant mèdics com quirúrgics conservadors de la fertilitat. En aquests casos caldrà plantejar l'administració, després de la cirurgia, de teràpia hormonal substitutiva amb estrògens i progestàgens per tal d'evitar una possible hiperplàsia en els focus ectòpics residuals (Dunselman et al., 2014; Vercellini et al., 2014).

Si l'opció que es considera és la cirurgia conservadora de la fertilitat, l'objectiu serà l'exèresi de tots els focus d'E visibles, tant els d'ESP com els d'EP, especialment els localitzats en regions anatòmiques compromeses (vies urinàries i tracte

intestinal) i la restauració de la seva funcionalitat, el tractament dels EO i de les adherències presents. Molt sovint, la indicació d'aquest tipus de tractament quirúrgic és l'alleujament temporal del dolor i la resecció de focus d'EP en àrees anatòmiques compromeses en dones amb desig genèsic (Vercellini et al., 2014).

La cirurgia de l'E, sigui radical o conservadora, no està exempta de potencials complicacions, com la generació d'adherències postquirúrgiques i les pròpies del procediment quirúrgic, que dependran del tipus de lesió extirpada i de la seva localització anatòmica. El tractament quirúrgic dels implants d'EP és el que presenta un major percentatge de complicacions, especialment en casos d'afectació intestinal (Dunselman et al., 2014; Vercellini et al., 2014). De fet s'ha descrit un 2.1% de complicacions intraquirúrgiques i un 14.1% de complicacions postquirúrgiques (essent, d'aquestes, un 9.5% complicacions menors i un 4.6%, majors) (Dunselman et al., 2014). Pel que fa a les recurrències en el cas de la cirurgia conservadora, s'ha descrit que fins a un 40-45% de pacients presentaran una recurrència als 5 anys de la cirurgia primària i requeriran cirurgies subsegüents. Segons alguns autors, més d'un 25% de les pacients seran sotmeses a 3 o més cirurgies al llarg de la seva vida (Guo, 2009). Aquest és un fet de rellevant importància ja que aquestes pacients presentaran un increment de la morbiditat i un empitjorament de la seva qualitat de vida, amb els subsegüents costos afegits i, en cas de requerir tractament quirúrgic de l'EO, un risc d'afectació de la seva reserva ovàrica.

De fet, el tractament de l'EO ha esdevingut un tema de gran controvèrsia en els últims anys. Malgrat que el tractament quirúrgic dels EO ha demostrat una milloria en les àlgies pelvianes referides per les pacients i molts estudis indiquen un increment de les gestacions espontànies, la cirurgia dels EO presenta una gran problemàtica pel risc d'afectació de la reserva ovàrica i de recurrència. Fins a data d'avui s'han descrit diverses tècniques quirúrgiques ablatives a considerar com a alternativa a la quistectomia ovàrica mitjançant *stripping* per tal de reduir el dany al còrtex ovàric sa adjacent a l'EO a tractar i, per tant, minimitzar l'afectació de la reserva ovàrica de la pacient. El dany quirúrgic al teixit ovàric sa s'atribueix, no només al procediment quirúrgic *per se*, sinó que s'especula que podria estar també relacionat amb altres mecanismes implicats en la cirurgia com el compromís vascular subsegüent i l'estat inflamatori postquirúrgic (Sugita et al., 2013). Per tal de minimitzar el dany al teixit ovàric sa i reduir l'estat inflamatori postquirúrgic, s'ha descrit, com a alternativa a la quistectomia, el drenatge i posterior ablació de la paret

quística mitjançant la coagulació amb energia bipolar, la vaporització amb làser CO₂ o, fins i tot, amb plasma. Aquestes dues últimes tècniques ofereixen l'avantatge que el dany tèrmic al còrtex ovàric subjacent és mínim en comparació amb l'ús de l'energia bipolar (Jadoul et al., 2012). Alternativament, s'ha descrit la possibilitat de tractar l'EO en dos temps (en cas de mides superiors a 5-6 cm) mitjançant un drenatge inicial del contingut, el tractament posterior de la pacient mitjançant agonistes de la GnRH durant 12 setmanes i posteriorment una segona laparoscòpia per tal de vaporitzar la paret interior del quist (Donnez et al., 2010; Tsolakidis et al., 2010). Donnez et al. (2010) també van descriure la possibilitat de tractar els EO mitjançant la combinació de les dues tècniques (quistectomia mitjançant *stripping* i ablació mitjançant vaporització amb làser CO₂ de la zona propera a l'hili) sense tenir cap efecte deleteri sobre l'ovari (Donnez et al., 2010). S'han dut a terme múltiples estudis comparant les tècniques excisionals i ablatives i els seus resultats en relació a l'afectació de la reserva ovàrica, ja que és un tema de cabdal importància en les pacients afectes d'E que, per definició, presenten una prevalença d'esterilitat més elevada que la població general. Els resultats d'aquests estudis indiquen que la quistectomia ovàrica presenta una major reducció del volum ovàric i una major afectació dels marcadors de reserva ovàrica (reducció del recompte de fol·licles antrals i del valor d'hormona anti-mülleriana i augment dels valors de fol·litropina) en comparació amb les tècniques ablatives, essent aquests resultats pitjors en cas de dones de major edat i de presència d'EO bilaterals (Tsolakidis et al., 2010; Roman et al., 2011; Alborzi et al., 2014; Candiani et al., 2018). Tot i així, cal dir que no hi ha estudis a llarg termini amb dades concloents sobre el nombre de gestacions i de nascuts vius en aquestes pacients intervingudes (Shah et al., 2014).

Malgrat que les tècniques ablatives semblen oferir un cert avantatge respecte l'*stripping* pel que fa a la preservació de la reserva ovàrica, presenten un possible increment de les recidives dels EO (Hart et al., 2008). No obstant, en un estudi aleatoritzat de Carmona et al. (2011) comparant l'*stripping* i la vaporització amb làser CO₂ en el tractament dels EO amb un seguiment a 5 anys, tot i que inicialment el grup sotmès a vaporització amb làser CO₂ va presentar un major nombre de recidives i de forma més precoç que les pacients sotmeses a exèresi mitjançant *stripping*, als 5 anys no es van detectar diferències estadísticament significatives (Carmona et al., 2011). De la mateixa manera, en un estudi recent (Muzii et al., 2016) en què es comparava la cirurgia mitjançant *stripping* i el tractament combinat

excisional i ablatiu (Donnez et al., 2010), no es van objectivar diferències estadísticament significatives en les taxes de recurrència.

Pel que fa a la reducció de les àlgies pelvianes, el tractament quirúrgic dels EO ha demostrat una milloria en les àlgies pelvianes comparat amb el tractament expectant (Hart et al., 2008). Tot i així, sembla ser, segons els resultats d'alguns estudis, que les tècniques excisionals i no les ablatives, presentarien millors resultats en la reducció del dolor de les pacients intervingudes (Hart et al., 2008; Pundir et al, 2017).

En conclusió, el tractament quirúrgic d'elecció en les pacients amb E és la cirurgia mínimament invasiva i la tècnica aplicada dependrà de la simptomatologia que refereixi la pacient, la seva edat i la presència o no de desig genèsic, la resposta prèvia al tractament mèdic, la localització i extensió de les lesions, el compromís d'estructures anatòmiques i la presència d'EO, la seva mida i característiques. En aquest últim cas, cal tenir en compte la tècnica aplicada en termes de risc d'afectació de la reserva ovàrica i taxes de recurrència. Les tècniques ablatives, en comparació amb les excisionals han demostrat, en general, una menor afectació del teixit ovàric sa, fet que podria estar relacionat tant amb la tècnica quirúrgica en si com amb el compromís vascular i l'estat inflamatori postquirúrgic.

1.5. FISIOPATOLOGIA DE L'ENDOMETRIOSI

L'E es considera, avui en dia, una patologia ginecològica inflamatòria estrogen-dependent que es caracteritza per la presència de teixit endometrial (glàndules i estroma) fora de la cavitat uterina, generalment a nivell del compartiment pelvià (Giudice and Kao, 2004; Vercellini et al., 2014). Es tracta d'una entitat de la qual encara es desconeixen l'etiologia i la fisiopatologia exactes (Burney and Giudice, 2012; Reis et al., 2013) i per aquest motiu s'han elaborat múltiples teories que explicarien l'aparició de teixit endometrial en localitzacions extrauterines.

1.5.1. Teories de l'origen de l'endometriosi

La teoria més acceptada és la de la menstruació retrògrada, elaborada per Sampson a la dècada de 1920 (Sampson, 1922; Sampson, 1927). Aquesta proposa que l'E tindria el seu origen en la menstruació retrògrada del teixit endometrial a través de les trompes de Fal·lopi cap a la cavitat peritoneal. Posteriorment, per la supervivència d'aquest teixit a nivell intraperitoneal, sobretot a nivell pelvià, hi intervindrien factors relacionats amb la invasió dels teixits, proliferació, angiogènesi i evasió de la resposta immunitària. Tot això estaria afavorit per factors genètics, epigenètics, ambientals, hormonals i immunològics. No obstant, també s'han descrit altres teories sobre l'origen de l'E. Entre aquestes destaca la teoria de la metaplàsia celòmica, en la que el teixit normal peritoneal es transformaria en teixit endometrial ectòpic per efecte de certs agents intrínsecs o extrínsecs com podrien ser factors hormonals, immunològics o endocrinològics, com els anomenats disruptors endocrins. Una altra teoria descrita és la de les restes embriològiques mullerianes, en la que es descriu que cèl·lules residuals procedents de la migració dels conductes mullerians mantindrien la capacitat per esdevenir lesions endometriòsiques en cas d'estímuls estrogènics endògens o exògens. Finalment, més recentment també s'ha descrit la possible diferenciació de cèl·lules progenitores de línia mesenquimal o endotelial localitzades a la medul·la òssia en teixit endometriòsic i la teoria de la metàstasi benigna en la que els implants endometrials ectòpics serien conseqüència de la disseminació hematògena o limfàtica de les cèl·lules endometrials (Burney and Giudice, 2012).

Tot i aquestes teories que explicarien la localització ectòpica del teixit endometrial en l'E, calen mecanismes addicionals per a la seva supervivència i proliferació a nivell extrauterí. Per aquest motiu, en la fisiopatologia de l'E també hi intervenen factors genètics, epigenètics, ambientals, hormonals, immunològics i mecanismes relacionats amb la vasculogènesi, la neuroangiogènesi i la proliferació cel·lular, que a continuació s'exposen (Burney and Giudice, 2012; Vercellini et al., 2014).

1.5.2. Mecanismes fisiopatològics de l'endometriosi

Les cèl·lules endometrials de les pacients amb E, tant a nivell eutòpic com ectòpic, presenten unes característiques diferencials respecte a l'endometri de les pacients sense E. Per una banda, s'ha observat una dependència als estrògens i una resistència a la progesterona a través d'un augment de la producció local d'estrògens i de receptors estrogènics i d'una reducció dels receptors de progesterona així com una alteració en les vies de senyalització de la progesterona, que té com a conseqüència una transició incompleta de l'endometri proliferatiu al secretori i, a la vegada, un efecte antiapoptòtic. Per altra banda, també s'ha descrit una sobreexpressió del gen BCL-2 que té un rol antiapoptòtic. Tot això facilitarà, per tant, la supervivència i proliferació del teixit endometrial extrauterí. A aquest fet també hi contribuirà un increment de la resposta inflamatòria local i una disfunció dels mecanismes immunològics que perpetuaran aquest microambient inflamatori. A nivell histològic s'ha observat un increment de l'infiltrat limfocitari al teixit endometrial (Reis et al., 2013), i a nivell cel·lular i molecular s'ha descrit una major resistència a les cèl·lules *natural killer* (NK) per part del teixit endometrial en dones amb E, i una disfunció dels macròfags, que expressen nivells majors de COX-2 i alliberen una major quantitat de prostaglandines, en comparació amb les dones sanes, a més d'una elevada concentració de proteases i citoquines proinflamatòries entre les que destaquen la interleuquina (IL) IL-6, la IL-8 i el factor de necrosi tumoral-alfa o *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α). Aquestes alteracions del sistema immunitari que predisposarien a l'E també s'han descrit en altres malalties autoimmunitàries i d'origen atòpic, fet que faria pensar que possiblement comparteixen certs aspectes de la seva fisiopatologia. Finalment, els mecanismes pels quals les cèl·lules endometrials s'adhereixen i envaeixen les estructures extrauterines serien similars a altres patologies inflamatòries cròniques i patologies malignes; de fet, s'ha descrit una sobreexpressió de les MMP, del factor transformador de creixement-beta o *transforming growth factor-beta* (TGF- β) i també de factors involucrats en l'angiogènesi i la neurogènesi com el factor de creixement vascular endotelial o *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Totes aquestes troballes s'han descrit tant a nivell del teixit endometrial ectòpic i eutòpic però també a nivell del líquid peritoneal (Giudice and Kao, 2004; Bulun, 2009; Burney and Giudice, 2012; Reis et al., 2013; Vercellini et al., 2014).

Pel que fa als factors genètics i ambientals, s'ha descrit un augment de 6 vegades el risc de patir E en dones familiars de primer grau de pacients amb E severa i aquest risc estaria relacionat amb alteracions genètiques relacionades amb la supervivència i la proliferació cel·lulars. Com a factors epigenètics s'ha detectat una alteració en la metilació de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) de promotors de gens crítics per a la resposta normal de l'endometri als estrògens i la progesterona, de la mateixa manera que també s'ha descrit una expressió diferencial de microRNA, fet que estaria relacionat alhora amb l'expressió diferencial d'hormones esteroïdals (Burney and Giudice, 2012). A banda de tot això, també s'ha postulat un possible paper de les dioxines com a disruptors endocrins en el desenvolupament de l'E (Martínez-Zamora et al., 2015).

En conclusió, l'E és una patologia ginecològica, estrogen-dependent, amb una fisiopatologia encara no completament coneguda, però en la que hi intervindrien factors genètics, epigenètics, ambientals, hormonals i immunològics i mecanismes proinflamatoris que contribuirien a la supervivència i proliferació del teixit endometrial. S'han descrit alteracions histològiques, cel·lulars i moleculars similars a altres condicions inflamatòries cròniques com malalties autoimmunitàries i patologies malignes, pel que actualment, l'E també és considerada una malaltia inflamatòria.

1.6. L'ENDOMETRIOSI COM A PATOLOGIA INFLAMATÒRIA

1.6.1. L'endometriosi com a patologia inflamatòria sistèmica i l'endometriosi profunda com a fenotip diferenciat

Un dels aspectes més rellevants en la fisiopatologia de l'E és que en els últims anys hi ha cada vegada més evidència de la seva conceptualització com a condició inflamatòria crònica (Reis et al., 2013). Aquest fet deriva de les troballes prèviament descrites sobre la disfunció del sistema immunològic i l'increment de la resposta inflamatòria local que es tradueix en un increment de l'infiltrat limfocitari i del complement, un increment en l'activació anòmala de macròfags que generen majors

nivells de prostaglandines i COX-2 i un increment de factors antiapoptòtics, angiogènics i proteases així com citokines proinflamàtores entre les que destaquen la IL-6, la IL-8 i el TNF- α . Aquestes troballes s'han descrit en el teixit endometrial tant ectòpic com eutòpic i també en el líquid peritoneal de pacients amb E (Bulun 2009; Reis et al., 2013; Vercellini et al., 2014). Però més enllà d'aquests fenòmens locals, cada vegada hi ha més evidència que les pacients amb E presenten un ambient inflamatori i una disfunció immunitària també a nivell sistèmic, amb trets similars a altres malalties inflamàtores cròniques (Agic et al., 2006; Gemmill et al., 2010; Carmona et al., 2012; Kvaskoff et al., 2015; Monsanto et al., 2016; Alderman et al., 2017).

En els últims anys s'ha postulat que l'EP podria presentar mecanismes fisiopatològics específics que farien d'ella una entitat diferenciada dels altres fenotips (EO i ESP). L'EP ha estat descrita com la forma més agressiva de la malaltia, amb una major gravetat de l'afectació clínica i un maneig terapèutic més difícil (Tosti et al., 2015; Donnez, 2017; Gordts et al., 2017). Tot i que, com l'E en general, la seva fisiopatologia és en part desconeguda, la literatura descriu una disfunció a nivell hormonal i immunitari més severa que en la resta de fenotips. S'ha observat una major alteració hormonal, una major activitat de mecanismes antiapoptòtics i de factors proliferatius i una major expressió de factors relacionats amb la invasió dels teixits, l'angiogènesi i la neurogènesi en el cas de l'EP en comparació amb l'EO i l'ESP. Aquests mecanismes fisiopatològics diferenciats en comparació amb l'EO i l'ESP podrien explicar la seva major agressivitat i gravetat (Tosti et al., 2015), ja que presentaria un ambient inflamatori superior a la resta de formes clíniques.

1.6.2. La relació entre inflamació i hemostàsia en l'endometriosi

En relació a l'ambient inflamatori, diverses línies de recerca han demostrat una estreta relació entre inflamació i hemostàsia. Els mecanismes de la coagulació i la immunitat innata són processos relacionats des del punt de vista evolutiu amb l'objectiu de col·laborar com a sistemes de defensa cabdals a l'organisme davant de patògens o lesions externes (Keragala et al., 2018). Però més enllà d'aquest fet, en diverses condicions inflamàtores, com ara les neoplàsies, la sèpsia o les malalties inflamàtores cròniques, s'ha descrit una disfunció endotelial i un estat

d'hipercoagulabilitat. En aquest context, inflamació i coagulació semblen interactuar l'una amb l'altra de manera que la inflamació activaria la cascada de la coagulació i els fenòmens hemostàtics modularien l'activitat inflamatòria (Wu Y. et al., 2015; Date et al., 2017).

L'endoteli, activat per la hipòxia o pels estímuls inflamatoris, expressa molècules d'adhesió com la P-selectina i la E-selectina i el factor von Willebrand, que faciliten la unió dels leucòcits circulants a través del lligant de la P-selectina o *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1), així com també la unió de les plaquetes i de les micropartícules circulants o *circulating cell-derived microparticles* (cMP) (Mackman, 2012). Un efecte clau dels mediadors de la inflamació és la inducció de l'expressió del factor tissular o *tissue factor* (TF) a la superfície dels leucòcits. Diferents citokines proinflamatòries, com la IL-6, la IL-8 i el TNF- α , poden promoure un estat procoagulant a través de la inducció de l'expressió de TF, augmentant d'aquesta manera la quantitat o *pool* de TF potencialment disponible per participar en els processos de coagulació (Saghazadeh et al., 2015). A més, els leucòcits exposats a citokines proinflamatòries són més propensos a la microvesiculació i, per tant són capaços de produir cMP que poden ser reclutades al trombus en formació a través de la interacció entre PSGL-1 i P-selectina (Date et al., 2017). A part d'aquestes vies d'activació de la coagulació, recentment s'ha descrit que mediadors de la inflamació com els polifosfats i la bradiquinina, entre d'altres, poden activar directament el sistema de contacte i iniciar la coagulació per aquesta via (Wu Y. et al., 2015).

Les plaquetes també tenen un paper fonamental en la relació entre els fenòmens inflamatoris i hemostàtics. A part de la seva funció en l'hemostàsia i la trombosi, desenvolupen un rol important en la iniciació i modulació de les respostes inflamatòries i immunitàries de l'organisme (Jenne et al., 2013; Franco et al., 2015; Varon and Shai, 2015). Les plaquetes poden alliberar citokines i altres mediadors proinflamatoris, immunomoduladors i proangiogènics davant la presència de patògens o noxes, però també tenen la capacitat de generar cMP, en resposta al dany cel·lular, l'activació cel·lular i/o l'apoptosi. A més, hi ha evidències que les cMP poden transferir el seu potencial procoagulant a altres tipus cel·lulars augmentant així l'activació endotelial (Morel et al., 2006). Les plaquetes activades expressen P-selectina a la seva superfície (Guo et al., 2015) que, com ja s'ha esmentat, facilitarà la interacció amb els neutròfils, podent induir en aquests la generació de trampes

extracel·lulars de neutròfils o *neutrophil extracellular traps* (NETs), que consisteix en l'expulsió a l'espai extracel·lular del contingut nuclear d'ADN i histones i també d'enzims cel·lulars, entre ells proteases com la mieloperoxidasa (MPO). Els NETs estarien implicats, en un context inflamatori, en la generació d'un major dany tissular, el manteniment de la resposta immunitària innata, el desenvolupament de la resposta immunitària adaptativa i la promoció d'un estat protrombòtic (Franco et al., 2015; Jenne et al., 2013; Jenne and Kubes, 2015).

Per la seva banda, el TF, mitjançant la formació d'un complex amb el factor VII activat (TF/FVIIa), desenvolupa un paper molt important en l'inici de l'activació de la cascada de la coagulació però també s'ha descrit la seva implicació en fenòmens inflamatoris i angiogènics a través de vies de senyalització intracel·lular no hemostàtiques (Coughlin, 2000; Mackman, 2009). Això deriva en la producció de citoquines i factors de creixement que promouran la inflamació i l'angiogènesi (Date et al., 2017).

L'E, com a condició inflamatòria que és, també podria presentar alteracions en l'hemostàsia que derivarien en un estat d'hipercoagulabilitat. Hi ha algunes dades que suggereixen aquestes alteracions. En alguns estudis s'ha observat un escurçament del temps de trompoblastina parcial activada (Wu Q. et al., 2015; Viganò et al., 2018) i del temps de trombina així com un increment en els nivells de fibrinogen en pacients amb E comparat amb controls. També s'ha detectat un percentatge significativament major de plaquetes circulants activades en pacients amb E i una disminució significativa d'aquets valors un mes després de la cirurgia de l'E (Wu Q. et al., 2015). A més, s'especula que les plaquetes participarien de manera important en el desenvolupament de l'E, ja que s'han detectat agregats plaquetaris en les implants endometriòsics i un increment concomitant de la proliferació cel·lular i de factors proinflamatoris i neoangiogènics (Ding et al., 2015). Finalment, Guo et al. (2015) també han descrit la implicació de la P-selectina, marcador principal de l'activació plaquetària, en l'E i que el sagnat cíclic que tindria lloc als implants endometriòsics podria agregar i activar plaquetes a aquestes localitzacions i, en conseqüència, afavorir la producció de cMP (Guo et al., 2015). En relació al TF, s'ha objectivat un increment de la seva expressió tant a l'endometri eutòpic com ectòpic de pacients amb E comparat amb controls. Aquest fet podria ser un reflex de

l'increment de citoquines inflamàtòries per part d'aquest endometri en les pacients amb E (Krikun et al., 2008).

En referència a l'EP, s'han descrit característiques patogèniques específiques i diferenciades a les dels altres fenotips d'E, com ara una disminució de l'apoptosi, un increment de l'activitat proliferativa relacionada amb l'estrés oxidatiu i una major expressió de mecanismes invasius (Tosti et al., 2015). Aquestes característiques específiques podrien derivar en un ambient inflamatori més marcat i una major alteració dels paràmetres d'hemostàsia en l'organisme d'aquestes pacients.

En conclusió, l'E és una malaltia inflamatòria sistèmica, i l'EP podria representar un fenotip diferenciat en comparació amb l'EO i l'ESP pel fet de presentar diversos mecanismes fisiopatològics específics que implicarien un ambient inflamatori superior i justificarien la seva major agressivitat i gravetat. En les darreres dècades s'ha evidenciat l'íntima relació entre els fenòmens inflamatoris i hemostàtics i, per tant, l'estat d'hipercoagulabilitat de les patologies inflamatòries. En l'interès creixent pel coneixement dels mecanismes implicats en el desenvolupament i progressió de l'E també s'ha estudiat aquesta relació i sembla haver-hi evidència científica ferma que l'E presentaria alteracions de l'hemostàsia que podrien donar lloc a un estat d'hipercoagulabilitat. Els mecanismes més novedosos que interactuen en aquesta íntima relació entre coagulació i inflamació, com les cMP, el TF i els NETs, podrien estar, per tant, involucrats en la fisiopatologia de l'E.

La present tesi doctoral se centrarà en l'estudi de les cMP, el TF i els NETs com a possibles mecanismes implicats en la fisiopatologia de l'E i, en concret, de l'EP, i l'avaluació de les cMP com a marcadors de dany tissular secundari al tractament quirúrgic de l'endometriosi.

1.6.3. Les micropartícules circulants i el factor tissular en l'endometriosi

Les cMP són vesícules inferiors a 1µm de diàmetre que es generen a partir de l'alliberació de fragments de membranes plasmàtiques de diversos tipus de cèl·lules en resposta al dany cel·lular, l'activació cel·lular i/o l'apoptosi (Piccin et al., 2007; Buzas et al., 2014). La major part d'elles deriven de plaquetes, cèl·lules endotelials i

leucòcits (Lynch and Ludlam, 2007). Aquestes cMP podrien actuar com a missatgers biològics amb un rol propi en la inflamació, el dany vascular, l'angiogènesi i la trombosi, i també podrien ser possibles transportadors de material genètic (microRNA) que podria estar relacionat amb una modificació del fenotip de les cèl·lules amb les que interactuarien (Buzas et al., 2014).

Les cMP es generen per una reorganització del citoesquelet i una alteració de la bicapa lipídica secundàries a un increment del calci intracel·lular que té lloc quan hi ha un dany cel·lular (ja sigui per apoptosi, acció de citoquines o endotoxines, per hipòxia o per activació cel·lular). Aquest fet dóna lloc a l'expressió a la superfície de les cMP de fosfatidilserina, un fosfolípid aniònic que ofereix una superfície a la qual es poden ancorar els factors de la coagulació per la seva subsegüent activació. A més, algunes de les cMP generades a partir de cèl·lules de diferents orígens expressaran a la seva superfície TF i PSGL-1, molècules que contribuiran a la seva unió a l'endoteli i a les plaquetes activades i seran una font addicional de TF al lloc de la lesió, fet que facilitarà l'activació de la cascada de la coagulació, que finalment donarà lloc a la generació de trombina i posterior fibrina (Leroyer et al., 2010; Buzas et al., 2014).

Les cMP, a més, són capaces de reclutar cèl·lules inflamatòries (limfòcits, cèl·lules NK, macròfags i neutròfils) i estimular la producció de COX-2 per la presència d'àcid araquidònic a la seva superfície. També contribueixen a l'activació i alliberació de citoquines proinflamatòries degut a les interaccions de les molècules de la seva superfície amb els receptors dels leucòcits i les cèl·lules endotelials (Meziani et al., 2008). Finalment, les cMP expressen proteases que podrien contribuir al seu efecte proangiogènic (Leroyer et al., 2010).

Per tots aquests aspectes, actualment, les cMP no es consideren únicament marcadors de dany cel·lular, sinó que són moduladors de funcions clau en l'hemostàsia, la immunitat, la inflamació i l'angiogènesi. De fet, en els últims anys, s'ha detectat una elevació en el número de cMP en condicions on la disfunció vascular i la inflamació són mecanismes fisiopatològics importants, com la malaltia cardiovascular, la diabetis, alteracions trombotiques com la púrpura trombotica trombocitopènica, el tromboembolisme venós, el lupus eritematós sistèmic i la síndrome antifosfolipídica; condicions inflamatòries com la sèpsia, la malaltia de Crohn, l'artritis reumatoide i l'esclerosi múltiple; processos malignes i complicacions de l'embaràs com fracassos d'implantació, avortaments de repetició i preeclàmpsia (Lynch and Ludlam, 2007; Meziani et al., 2008; Martínez-Zamora et al., 2016a;

Martínez-Zamora et al., 2016b). L'estudi de les cMP ha generat un gran interès, no només per la seva implicació en la patogènesi de múltiples malalties, sinó també pel seu potencial com a biomarcador de patologies inflamatòries i el seu possible rol com a diana terapèutica (Barteneva et al., 2013; Buzas et al., 2014; Revenfeld et al., 2014).

En relació a l'angiogènesi, estudis recents impliquen el TF com un factor clau, i tant és així que s'ha demostrat que la seva deficiència seria letal per als ratolins *knock out* (TF (-)/(-)) (Bugge et al., 1996; Toomey et al., 1996). El TF circula, en la seva major part, unit a cMP procedents de monòcits i macròfags (micropartícules circulants portadores de factor tissular o *circulating tissue factor-containing microparticles*, cMP-TF) o com una proteïna soluble (factor tissular soluble o *soluble tissue factor*, sTF). La funció angiogènica del TF té lloc, principalment, mitjançant la via de senyalització del PAR (*protease activated receptor*) (Coughlin, 2000; Kikrun et al., 2009). El complex TF/VIIa s'uneix a PAR-2 i activa l'angiogènesi de manera directa per la inducció de l'alliberació de VEGF en múltiples tipus cel·lulars a través de l'activació de la via de la MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Ruf et al., 2011; Osuga et al., 2012). Addicionalment, el complex TF/VIIa pot estimular de manera indirecta l'angiogènesi a través de la generació de trombina, ja que la unió d'aquesta a PAR-1 també activa la via MAPK i augmentarà, conseqüentment, l'expressió de VEGF (Versteeg et al., 2006; Chandrasekharan et al., 2010; Furukawa et al., 2009).

El TF, per tant, no només té un paper rellevant en l'hemostàsia participant en la cascada de la coagulació en cas de dany vascular i contribuint a la trombosi arterial i/o venosa en cas de condicions patològiques, sinó que també desenvolupa un paper important en l'angiogènesi sobretot en patologies malignes i inflamatòries (Mackman, 2009). En el cas concret de l'E, estudis previs han demostrat que l'endometri eutòpic i ectòpic presenten un augment de l'expressió del TF i PAR-2 a les cèl·lules glandulars i que els implants endometriòsics presenten un increment de l'expressió de TF a les cèl·lules endotelials i macròfags (Kikrun et al., 2008; Kikrun, 2012; Lin et al., 2012; Ding et al., 2015). A més, s'ha observat que, tot i que els nivells plasmàtics de cMP-TF són baixos en condicions normals, poden incrementar-se en condicions patològiques com neoplàsies, estats infecciosos o d'hipercoagulabilitat (Van Es et al., 2015).

Tal i com ja s'ha esmentat prèviament, l'E és una malaltia inflamatòria en la que recentment també s'ha observat un estat d'hipercoagulabilitat (Wu Q. et al., 2015; Viganò et al., 2018) pel que, de forma similar a altres patologies inflamatòries, pot presentar un increment en el contingut plasmàtic de les cMP, tant totals com les que expressen TF (cMP-TF). En aquest sentit, no s'ha publicat cap estudi fins a la present tesi sobre els nivells plasmàtics de cMP, cMP-TF i sTF en pacients amb E per valorar la seva possible implicació en la fisiopatologia d'aquesta malaltia ginecològica.

1.6.4. Els *neutrophil extracellular traps* (NETs) en l'endometriosi

En la fisiopatologia de moltes malalties inflamatòries cròniques s'ha descrit una activació excessiva i prolongada de la immunitat innata, que presenta com a conseqüència una activació excessiva de la immunitat adaptativa. Aquesta activació redundat del sistema immunitari innat és el resultat d'un estat inflamatori crònic a l'organisme, i estarà provocat per factors exògens i/o endògens. Un d'aquests factors descrit recentment són els NETs, que representen un mecanisme nou en la fisiologia dels neutròfils (Pinegin et al., 2015). Els neutròfils formen part del sistema immunitari innat i actuen com a primera línia de defensa mitjançant la fagocitosi i la posterior degradació intracel·lular dels patògens. Però al 2004 (Brinkmann et al., 2004) es va observar per primera vegada que aquests granulòcits també eren capaços d'eliminar els patògens de forma extracel·lular mitjançant l'alliberació de fibres de cromatina, que van anomenar trampes extracel·lulars de neutròfils o *neutrophil extracellular traps* (NETs).

La formació de NETs és conseqüència d'una forma de mort cel·lular molt especial i única que inclou la pèrdua inicial de totes les membranes intracel·lulars seguida de la desintegració de la membrana citoplasmàtica, amb la posterior sortida a l'exterior de tots els components intracel·lulars formant una estructura similar a una xarxa formada per filaments de cromatina descondensada d'uns 15-17 nm de diàmetre, que contenen ADN i histones, i amb estructures globulars d'uns 50 nm de diàmetre que inclouen proteïnes contingudes en els grànuls dels neutròfils, com elastasa, MPO, lactoferrina, catepsines, MMP i altres proteases. Aquest procés de

mort cel·lular amb la consegüent producció de NETs, anomenat "NETosi" també s'ha observat en eosinòfils, mastòcits i macròfags (Pinegin et al., 2015).

Inicialment, es va descriure una funció essencialment antimicrobiana dels NETs, gràcies a l'atrapament de bacteries, fongs i virus encapsulats, evitant d'aquesta manera la seva disseminació per l'organisme. Però en els últims anys, a part del seu rol en la defensa primària de l'organisme envers una infecció microbiana, també s'ha descrit la seva implicació en altres funcions immunitàries que podrien estar relacionades amb la fisiopatologia de diverses patologies autoimmunitàries i inflamatòries cròniques. De fet, s'ha observat un increment en els nivells de NETs en condicions inflamatòries i/o estats d'hipercoagulabilitat com la fibrosi quística, el lupus eritematós sistèmic, l'artritis reumatoide, la malaltia pulmonar obstructiva crònica, la vasculitis, la psoriasi, l'aterosclerosi, la preeclàmpsia, la trombosi i la sèpsia, entre d'altres (Gupta et al., 2007; Kessenbrock et al., 2009; Borissouf and ten Cate, 2011; Fuchs et al., 2012; Kaplan and Radic, 2012; Branzk and Papayannopoulos, 2013; Pinegin et al., 2015; Sørensen and Borregaard, 2016). S'ha postulat que aquest fet s'explicaria per l'acumulació de neutròfils en àrees amb dany tissular i en focus inflamatoris, ja sigui d'origen infecciosos o no infecciosos, secundàriament a la síntesi de citokines proinflamatòries generades principalment per macròfags. Aquest ambient proinflamatori induirà l'activació i mort cel·lular dels neutròfils en forma de NETosi i la formació subsegüent de NETs amb la presència, per tant, de cromatina i múltiples tipus de proteases que es creu que serien responsables, per una part, d'un major dany tissular, i per una altra, del manteniment i perpetuació de la resposta immunitària innata i del desenvolupament de la resposta immunitària adaptativa. Per altra banda, els components extracel·lulars dels NETs tenen efectes procoagulants i protrombòtics. S'ha descrit la possible implicació dels NETs en la promoció de l'adhesió, activació i agregació de plaquetes en les seves xarxes de cromatina, que acabaria induint la formació trombina i el dipòsit de fibrina (Pinegin et al., 2015; Rao et al. 2015). A més, els NETs poden reclutar cMP i cMP-TF, i aquest fet podria ser un factor important per a la localització i concentració de TF addicional prop del trombus en formació (Martinod et al., 2014). Addicionalment, la superfície polianiónica dels NETs serveix com a activador de la via intrínseca de la coagulació a través del sistema de contacte (Massberg et al., 2010).

Tot això, per tant, acabarà desenvolupant a un estat inflamatori i protrombòtic i un major dany tissular (Knight et al., 2012; Darrah and Andrade,

2013; Pinegin et al., 2015; Rao et al., 2015), que és propi de les malalties inflammatòries cròniques. És per aquest motiu que, en els darrers anys, els NETs no només s'han implicat en funcions antimicrobianes, sinó que semblen desenvolupar un paper important en el manteniment i progressió de condicions inflammatòries cròniques i estats d'hipercoagulabilitat.

L'E és considerada avui en dia una malaltia inflammatòria crònica i, tot i que la seva fisiopatologia és en part desconeguda, presenta similituds amb altres condicions inflammatòries i autoimmunitàries, per la qual cosa, els NETs també hi podrien implicats. Tan és així que, en un estudi realitzat per Berkes et al. (2014) es va observar un increment dels nivells de NETs al líquid peritoneal de pacients amb E, comparat amb pacients sense E. Per aquest motiu, els autors de l'estudi, el primer sobre la possible implicació dels NETs en aquesta patologia, especulaven que podrien presentar un rol en la seva fisiopatologia. Tot i així, no hi ha cap estudi fins a l'inclòs en la present tesi que hagi avaluat els nivells de NETs directament en plasma per valorar l'estat d'inflamació a nivell sistèmic d'aquestes pacients.

1.7. RELLEVÀNCIA I JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

L'E és una malaltia inflammatòria que afecta a dones en edat reproductiva, la fisiopatologia de la qual és encara en part desconeguda. Hi ha certa evidència que l'E podria presentar, a més, un estat d'hipercoagulabilitat. Múltiples estudis han determinat la implicació de factors proinflamatoris, neoangiogènics i procoagulants en la seva persistència i progressió. Actualment, no disposem d'eines que garanteixin l'èxit del tractament i n'evitin la seva persistència, progressió o recidiva ni que permetin la monitorització de la seva activitat, fet que representa la problemàtica principal del maneig d'aquesta patologia.

En els últims anys, hi ha cada vegada més evidència científica sobre la implicació de les cMP i els NETs en funcions d'hemostàsia, immunitat, inflamació i angiogènesi i diversos estudis mostren la seva elevació en malalties inflammatòries i trastorns protrombòtics. A més, estudis previs han demostrat un augment de l'expressió del TF al teixit endometrial de les pacients amb E. És sabut que el TF, que

a la circulació sanguínia se'l pot trobar en forma de sTF o unit a cMP (cMP-TF), no només té un paper important en l'hemostàsia, sinó també en l'angiogènesi. Per tot això, el fonament de la present tesi doctoral és investigar la possible implicació de les cMP, les cMP-TF, el sTF i els NETs en la fisiopatologia de l'E i la seva relació amb la gravetat de la malaltia. Si fos així, aquests factors podrien tenir, en un futur, un rol rellevant per identificar grups d'elevada activitat inflamatòria i permetre monitoritzar l'eficàcia dels tractaments i l'evolució de la malaltia en les pacients que la pateixen.

Per altra banda, múltiples estudis descriuen la generació de cMP en els procediments quirúrgics degut al dany cel·lular que es genera i la seva possible implicació en complicacions postquirúrgiques per mecanismes inflamatoris i procoagulants (Ikeda et al., 2003; Banz et al., 2016; Tempo et al., 2016). Per tant, l'avaluació dels seus nivells al llarg del temps i la comparació d'aquests segons la tècnica quirúrgica utilitzada per al tractament de pacients amb EO, excisional (*stripping*) o ablativa (làser CO₂), pot ser de gran utilitat per valorar el grau d'inflamació que representaria la noxa quirúrgica. Aquest fet podria estar relacionat amb l'afectació de la reserva ovàrica i la generació d'adherències postquirúrgiques que, com s'ha comentat anteriorment, són dos aspectes de gran rellevància en el maneig quirúrgic de les pacients amb E.

En base a tot l'esmentat anteriorment, sorgeixen les diferents hipòtesis de treball i es desprenen la intencionalitat i els objectius d'aquesta tesi doctoral, tal i com s'exposen a continuació.

2. HIPÒTESI DE TREBALL

2.1. HIPÒTESI PRINCIPAL

L'E és considerada una patologia inflamatòria sistèmica. Els nivells plasmàtics de micropartícules circulants (cMP), micropartícules circulants portadores de factor tissular (cMP-TF) i factor tissular soluble (sTF), així com també els nivells plasmàtics de *neutrophil extracellular traps* (NETs), podrien estar més elevats en les pacients amb E i, en especial, amb EP, atès que aquests factors semblen estar implicats en processos inflamatoris, procoagulants i neoangiogènics. Tenint en compte aquest fet, en les pacients amb EP, els nivells plasmàtics de cMP podrien correlacionar-se amb la gravetat de la malaltia.

Per altra banda, s'ha descrit la generació de cMP secundària a procediments quirúrgics degut al dany tissular. Considerant el seu rol com a marcadors de resposta inflamatòria tissular, els nivells plasmàtics de cMP avaluats al llarg del temps en pacients sotmeses al tractament quirúrgic d'un EO podrien ser superiors en cas d'aplicar una tècnica excisional (*stripping*) comparat amb una ablativa (làser CO₂), ja que el grau d'inflamació secundari a la noxa quirúrgica sembla ser superior en el primer cas. Aquest fet podria tenir implicacions d'especial importància perquè la tècnica quirúrgica utilitzada podria estar en relació amb una major afectació de la reserva ovàrica i una major generació d'adherències postquirúrgiques.

2.2 HIPÒTESIS ESPECÍFIQUES

De tot el que s'ha exposat anteriorment sorgeixen les següents hipòtesis de treball:

1. Les pacients afectades d'E haurien de presentar nivells plasmàtics de cMP, cMP-TF, sTF i NETs més elevats que les pacients sanes.
2. Els nivells plasmàtics de cMP, cMP-TF, sTF i NETs haurien de diferir segons la forma clínica de la patologia, essent més elevats en pacients amb EP, on el substrat inflamatori sembla ser major, comparat amb pacients amb E no profunda (ESP i/o EO).

3. Tenint en compte el seu possible paper com a marcadors d'activitat inflamatòria, en el cas de l'EP, els nivells plasmàtics de cMP s'haurien de correlacionar amb la gravetat de la malaltia.
4. Les pacients sotmeses a una tècnica excisional (*stripping*) per al tractament dels EO haurien de presentar nivells plasmàtics superiors de cMP, posteriors a la intervenció quirúrgica, en comparació amb les tractades mitjançant vaporització làser CO₂, donat que sembla ser que la resposta inflamatòria tissular podria ser major en el primer cas.

3. OBJECTIUS

3.1. OBJECTIUS PRINCIPALS

Els objectius principals d'aquest treball són:

1. Investigar la possible relació de les micropartícules circulants (cMP), les micropartícules circulants portadores de factor tissular (cMP-TF), el factor tissular soluble (sTF) i els *neutrophil extracellular traps* (NETs) amb la fisiopatologia de l'E i, en especial, de l'EP, tenint en compte la seva condició de patologia inflamatòria crònica.
2. Valorar la resposta inflamatòria de la cirurgia dels EO mitjançant una tècnica excisional (*stripping*) o ablativa (vaporització amb làser CO₂).

3.2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

Els objectius principals esmentats, es concreten en els següents objectius específics:

1. Avaluar els nivells plasmàtics de cMP, cMP-TF i sTF en pacients amb E confirmada quirúrgicament i en pacients sense E (**ESTUDI 1**).
2. Correlacionar els nivells plasmàtics de cMP, cMP-TF i sTF segons els diferents fenotips d'E (EO i EP) (**ESTUDIS 1**) i, si és possible, correlacionar els nivells plasmàtics de cMP segons la gravetat de l'EP (**ESTUDI 2**).
3. Avaluar els nivells plasmàtics de NETs en pacients amb E confirmada quirúrgicament i en pacients sense E i correlacionar-ne els nivells segons la presència o no d'EP (**ESTUDI 3**).
4. Avaluar la generació de cMP de forma seriada posteriorment a la cirurgia laparoscòpica per al tractament d'EO unilateral mitjançant la tècnica excisional (*stripping*) i la vaporització amb làser CO₂ (**ESTUDI 4**).

4. INVESTIGACIONS REALITZADES, MATERIALS I MÈTODES I RESULTATS

La descripció de les pacients i dels grups d'estudi inclosos en els treballs d'investigació i la metodologia utilitzada en cada cas per aconseguir els objectius plantejats anteriorment, es troben detalladament exposats a la secció de "Materials i Mètodes", així com també els resultats obtinguts a la secció "Resultats", de cadascun dels quatre articles que componen el cos doctrinal de la present tesi doctoral.

Els esmentats articles s'adjunten a continuació.

4.1. ESTUDI 1

TOTAL CIRCULATING MICROPARTICLE LEVELS ARE INCREASED IN PATIENTS WITH DEEP INFILTRATING ENDOMETRIOSIS

Article publicat a ***Human Reproduction***

Munrós J, Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Coloma JL, Torrente MA, Reverter JC, Carmona F, Balasch J.

Hum Reprod. 2017 Feb;32(2):325-331.

doi: 10.1093/humrep/dew319. Epub 2016 Dec 17.

Factor d'impacte de la revista: 4.990

1r quartil (Obstetrícia i Ginecologia)

Total circulating microparticle levels are increased in patients with deep infiltrating endometriosis

J. Munrós¹, M.A. Martínez-Zamora¹, D. Tàssies², J.L. Coloma¹,
M.A. Torrente², J.C. Reverter², F. Carmona¹, and J. Balasch^{1,*}

¹Department of Gynecology, Institut Clínic of Gynecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clínic of Barcelona – Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain ²Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

*Correspondence address. Tel: +34-932275436; Fax: +34-932279325; E-mail: jbalasch@ub.edu

Submitted on June 23, 2016; resubmitted on October 15, 2016; accepted on November 21, 2016

STUDY QUESTION: Are the levels of total circulating cell-derived microparticles (cMPs) and circulating tissue factor-containing microparticles (cMP-TF) increased in patients with endometriosis?

SUMMARY ANSWER: The levels of total cMP, but not cMP-TF, were higher in patients with endometriosis, and these were attributed to higher levels in patients with deep infiltrating endometriosis (DIE).

WHAT IS KNOWN ALREADY: Previous studies have reported elevated levels of total cMP in inflammatory conditions as well as higher levels of other inflammatory biomarkers in endometriosis. Increased expression of tissue factor (a transmembrane receptor for Factor VII/VIIa) in eutopic and ectopic endometrium from patients with endometriosis has been described. There is no previous data regarding total cMP and cMP-TF levels in patients with endometriosis.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: A prospective case–control study including two groups of patients was carried out. The E group included 65 patients with surgically confirmed endometriosis (37 with DIE lesions) and the C group comprises 33 women without surgical findings of any form of endometriosis. Patients and controls were recruited during the same 10-month period. Controls were the next patient without endometriosis undergoing surgery, after including two patients with endometriosis.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: Venous blood samples for total cMP and cMP-TF determinations were obtained at the time of surgery, before anesthesia at a tertiary care center. To assess total cMP, an ELISA functional assay was used and cMP-TF activity in plasma was measured using an ELISA kit.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: Total cMP levels in plasma were higher in the E group compared with the C group ($P < 0.0001$). The subanalysis of endometriosis patients with DIE or with ovarian endometriomas without DIE showed that total cMP levels were higher in the DIE group ($P = 0.001$). There were no statistically significant differences in cMP-TF levels among the groups analyzed.

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: This is a preliminary study in which the sample size was arbitrarily decided, albeit in keeping with previous studies analyzing cMP in other inflammatory diseases and other biomarkers in endometriosis. The control group included patients with other pathologies as well as healthy controls, and blood samples were taken at different phases of the cycle.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: Elevated total cMP levels in DIE patients may reflect an inflammatory and/or procoagulant systemic status in these patients. Further studies are warranted to confirm our findings and to assess the role of cMP levels in the pathophysiology of DIE.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): This study was supported in part by a grant from FIS-PIII/01560 and FIS-PIII/00977 within the 'Plan Nacional de I + D + I' and co-funded by the 'ISCIII-Subdirección General de Evaluación' and 'Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)' and by the grant 'Premi Fi de Residència Emili Letang 2015' from the Hospital Clínic of Barcelona. The authors have no competing interests to disclose.

Key words: endometriosis / deep infiltrating endometriosis / ovarian endometriomas / circulating cell-derived microparticles / total microparticles / tissue factor-containing microparticles / tissue factor / inflammation / coagulation

Introduction

In the last few years, there has been an increasing interest in the study of the so-called circulating 'microparticles' or 'microvesicles' (cMP). They are defined as 100–1000 nm cell-secreted phospholipid bilayer-bound structures shed from almost all cell membranes following cell activation or apoptosis (Piccin *et al.*, 2007; Buzas *et al.*, 2014). cMPs were initially considered to be inert cellular dust, but currently it is known that they display a wide range of activities in blood coagulation, inflammation, angiogenesis and cellular signaling (Buzas *et al.*, 2014). Furthermore, an intimate interaction between inflammation and coagulation has been reported in which cMP, platelets and the contact system (also named the plasma kallikrein–kinin system, composed of coagulation factors XI and XII, plasma prekallikrein and the nonenzymatic cofactor high-molecular-weight kininogen) may be involved (Wu, 2015). Higher levels of cMP have been described in systemic inflammatory diseases, thrombotic diseases and cancer (Barteneva *et al.*, 2013). A subset of cMP, which contain tissue factor (TF), called 'tissue factor-bearing cMP' (cMP-TF) has recently been described. In healthy individuals, low plasma levels of cMP-TF have been detected, but under pathological conditions, such as malignancy, sepsis and hypercoagulable states, it is thought that cMP-TF levels are increased (van Es *et al.*, 2015).

Endometriosis is now considered a chronic systemic inflammatory condition (Bulun, 2009; Vercellini *et al.*, 2014). Although its etiopathogenesis is still under debate, many molecular and cellular alterations may be involved (Bumei and Giudice, 2012). Three clinically different phenotypes have been described: endometriotic implants on the surface of the pelvic peritoneum, ovarian endometrioma (OE) and deep infiltrating endometriosis (DIE), the latter being the most severe form of the disease (Bulun, 2009; Vercellini *et al.*, 2014). Although the etiopathogenesis of different forms of endometriosis remains unclear (Bulun, 2009), the aggressiveness of DIE could be explained by an increased proliferation activity and more active invasive mechanisms, as well as an increased vasculogenesis, inflammation and neuroangiogenesis (Tosti *et al.*, 2015).

It has recently been postulated that women with endometriosis may be in an inflammatory and hypercoagulable state (Wu *et al.*, 2015). Previous studies analyzing endometriosis patients showed an increased expression of TF in eutopic and ectopic endometrium (Kikrun *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2015). It has been hypothesized that cyclic bleeding in endometriotic lesions may activate and aggregate platelets in these sites, and may induce the production of cMP (Guo *et al.*, 2015).

This notwithstanding, to our knowledge, no previous studies have evaluated total cMP and cMP-TF levels in endometriosis patients. Therefore, this preliminary study was undertaken to investigate total functional cMP and cMP-TF levels in patients with endometriosis.

Materials and Methods

Study design and subjects

This is a prospective case–control study designed to evaluate the levels of total functional cMP and cMP-TF in plasma in surgically confirmed endometriosis patients (E group). Plasma level of soluble tissue factor (sTF) was also analyzed. A control group included patients without surgical findings of any form of endometriosis (C group). For the specific purposes of this study, 102 patients were prospectively asked to participate. Patients and controls were recruited during the same 10-month period. Controls comprise the next patient without endometriosis undergoing surgery after including two patients with endometriosis. The study was approved by the Ethics Committee of our hospital. All except two women provided written informed consent. The E group consisted of patients with clinical suspicion of endometriosis (DIE and/or OE) that underwent surgery due to painful symptoms. In all these patients, a preoperative work-up was performed including clinical examination and transvaginal ultrasound, and among those patients with suspicion of DIE magnetic resonance imaging was also performed. After surgery, two groups of endometriosis patients, with or without DIE, were identified for a subanalysis: the DIE group consisted of women with DIE and the OE group was composed of women who underwent surgery for suspicion of OE ≥ 3 cm without DIE lesions, which was confirmed during the surgical procedure. Endometriosis findings were always confirmed by histological study. The C group included patients who underwent laparoscopy due to mild benign adnexal pathology (cystectomy or adnexectomy) or a request for tubal sterilization with no presurgical suspicion of endometriosis and without endometriosis or signs of inflammatory pelvic condition during surgery.

The inclusion criteria were: women aged between 18 and 40 years with a BMI < 30.00 kg/m². The exclusion criteria were: history of past or present malignancy, endocrine, cardiovascular and systemic diseases, pregnancy or breastfeeding ≤ 6 months before sample collection, premature ovarian failure or menopausal status, endometrial hyperplasia or polyps, uterine leiomyomata, use of hormonal contraception or other hormonal treatments and intake of any medication including anti-inflammatory drugs ≤ 3 months before sample collection (except for oral acetaminophen as painkiller ≤ 72 hours before sample collection) or having had an inflammatory disease or infectious conditions ≤ 6 months before sample collection.

Before surgery, clinical and epidemiological data were collected from all the individuals participating in the study. Patients were asked about dysmenorrhea, dyspareunia, dyschezia, dysuria and chronic pelvic pain quantification according to the visual analog scale (Bourdel *et al.*, 2015). The severity of these symptoms was defined when patients referred a score ≥ 7 (Chapron *et al.*, 2012). Reporting of hematuria or rectal bleeding was also registered.

Operative laparoscopy was performed in all patients by insertion of a 12-mm umbilical trocar and two or three 5-mm trocars in the lower abdomen. An inspection of the pelvic organs and peritoneum was performed followed by the surgical procedure indicated in each case. All tissue excised was sent for pathology examination to confirm or exclude endometriosis. Patients were definitively assigned to one of the two groups of

patients (C or E) after undergoing laparoscopy and histological study. All patients were operated on by one of two experienced gynecological laparoscopic surgeons using the same technique and instruments. The surgical team and the operating room staff have lengthy experience with advanced gynecological laparoscopy and instrumentation. An expert gynecological pathologist performed all the histopathological analysis. Figure 1 shows the flow chart of inclusion and drop-out of the patients included in the study. Two women who did not give informed consent were excluded (Fig. 1).

Among 65 patients in the E group, there were 37 patients with DIE (DIE group) and 28 with OE without DIE (OE group). In the DIE group, 19 patients had concomitant OE: 5 cases of right OE, 10 cases of left OE and 4 cases of bilateral OE. The following DIE forms were recorded: vesical ($n = 11$), ureteral ($n = 11$), retrouterine ($n = 21$), retrocervical ($n = 18$), uterosacral ligaments ($n = 25$), sigmoid ($n = 15$), rectovaginal septum ($n = 8$), other intestinal location ($n = 4$) and vaginal ($n = 3$). All DIE implants were excised during surgery. Patients in the OE group underwent cystectomy due to right ($n = 9$), left ($n = 12$) and bilateral ($n = 7$) OE. Superficial peritoneal endometriotic (PE) lesions were found in 71% of patients in the DIE group and 46% in the OE group. All patients in the DIE group were classified as Stage IV of the revised American Fertility Society (rAFS) classification with a median rAFS score (25th; 75th percentiles) of 81 (58–107). The median rAFS score (25th; 75th percentiles) for patients of the OE group was 26 (22–36), all being classified as Stage III.

The C group was composed of 33 patients undergoing surgery for benign adnexal pathology ($n = 23$) or request for tubal sterilization ($n = 10$). Patients undergoing surgery for benign adnexal pathology included unilateral ovarian cystectomy due to dermoid cyst ($n = 8$), paraovarian cyst ($n = 1$), serous cystadenoma ($n = 6$), mucinous cystadenoma ($n = 3$); bilateral cystectomy due to bilateral serous cystadenomas ($n = 1$) and right dermoid cyst and left serous cystadenoma ($n = 1$); unilateral adnexectomy due to dermoid cyst ($n = 1$) and ovarian fibroma ($n = 1$); and bilateral salpingectomy due to bilateral hydrosalpinx ($n = 1$).

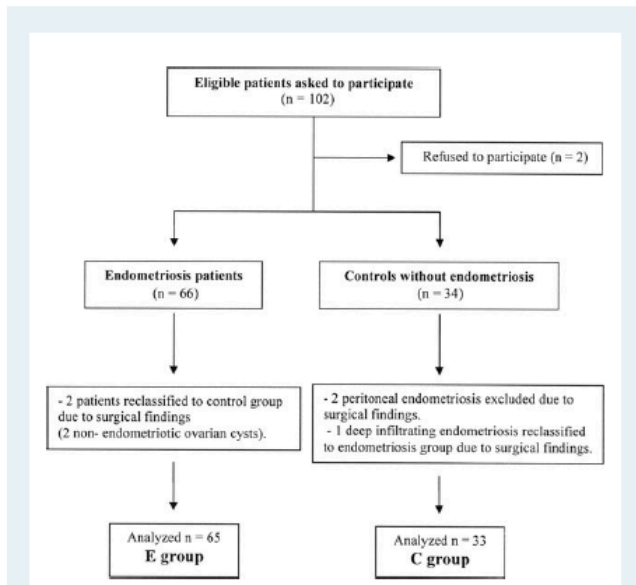


Figure 1 Flow chart of the inclusion and drop-out of patients in a study of circulating microparticles in endometriosis. E group = patients with surgically confirmed endometriosis; C group = women with benign adnexal pathology or request for tubal sterilization without surgical findings of any form of endometriosis.

Sample collection

Venous blood samples were all collected before preanesthetic medication intake and anesthesia induction by antecubital venous puncture in tubes containing 3.8% trisodium citrate (1/9, vol/vol; Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA), and platelet-free plasma was immediately obtained by double centrifugation, first at 2000g for 10 min at 22°C and then at 5000g for 10 min at 4°C. Plasma was aliquoted, snap-frozen in a mixture of dry ice/ethanol (1/2, vol/vol) and stored at -80°C .

In the E group, 57% of patients were sampled in the follicular phase and 43% in the luteal phase, while corresponding figures in the C group were 61 and 39%, respectively.

Sample analysis

Assays were performed by a single experienced operator. Samples were tested in duplicate. The mean absorbance values for each set of duplicate samples were calculated. When discordant results were obtained (sample values $>20\%$ of the mean), the samples were re-tested. There were no missing data or outliers. The operator was blind to the group allocation.

Total cMP analysis

To assess total cMP, we used a readily available commercial functional assay (Zymuphen MP-Activity, Hyphen BioMed, Neuville, France; Catalog number: 521096) as previously reported (Martínez-Zamora et al., 2016a,b). It is a prothrombinase assay based on the property of annexin-V, immobilized onto plastic wells, to bind phosphatidylserine (PS). Calibrators with known amounts of PS are used to obtain a standard curve, and the results are expressed as nanomolar PS equivalents. The calibration is validated when the quality controls provided by the kit are measured within their acceptance range, indicated for each lot on the flyer provided in the kit. The detection threshold of the assay is 0.05 nM. For cMP, the intra-assay coefficient of variation (CV) was 5% and the inter-assay CV was 8%. In this study, we used assay batch number 130207C.

Analysis of cMP-TF

cMP-TF activity in plasma was measured using an ELISA commercial kit according to the manufacturer's instructions (Zymuphen MP-TF, Hyphen Biomed, Neuville, France). In a first step, the samples are introduced into the wells of the microplate coated with a murine monoclonal antibody specific for human TF extracellular domain, which does not interfere with TF activity. cMP-TF present in the sample bind to the solid phase through an epitope localized in the extracellular domain of TF. Following overnight incubation and a washing step, wash solution is immediately introduced into the wells. Then, Factor VIIa and Factor X are added. The TF–FVIIa complex forms and subsequently activates Factor X into activated Factor X (FXa) on the surface of the anionic phospholipids present in the cMP and in the presence of Ca^{2+} . After that, a specific substrate for FXa is added and reacts with FXa producing a yellow color. The absorbance is recorded at 405 nm on a spectrophotometer and is directly proportional to the amount of cMP-TF present in the sample. A calibration curve is constructed. The calibration is validated when the quality controls are measured within their acceptance range, indicated for each lot on the flyer provided in the kit. The results were expressed as pg/ml. The detection threshold is ≤ 1 pg/ml. For cMP-TF, the intra-assay CV was 7% and the inter-assay CV was 10% (catalog number: 521196; batch number: 110315A).

Analysis of sTF in plasma

sTF was determined by quantitative sandwich ELISA (Quantikine Human Coagulation Factor III/Tissue Factor Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer's instructions. The

results were expressed as pg/ml. Intra- and inter-assay CVs were 3 and 6%, respectively.

Sample size and statistical analysis

As this is a preliminary study to investigate the levels of total cMP and cMP-TF in patients with endometriosis, the sample size was decided arbitrarily, albeit in keeping with previous studies analyzing cMP in other inflammatory diseases (Giuducci et al., 2008; Leonetti et al., 2013) and biomarkers in endometriosis (Fassbender et al., 2013).

Statistical analysis was performed with the Statistical Package for the Social Sciences software, Release 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Continuous variables were compared using the nonparametric Mann–Whitney *U* test or Kruskal–Wallis test using the post hoc Dunn's multiple comparison test, when appropriate, and presented as median with interquartile range (25th; 75th percentiles). Categorical variables were compared using the Chi-square test and presented as total count and relative percentages (%). Statistical significance was defined as a *P*-value < 0.05.

Results

Clinical characteristics of the subjects

The baseline clinical characteristics of the two groups of patients included in the study are presented in Table 1. The median age, BMI and tobacco use were similar in the two groups analyzed. As expected, there were more patients in the E group with severe dysmenorrhea and dyschezia compared with the C group.

Total cMP levels

Total cMP levels were significantly higher in the E group compared with the C group ([median nM PS eq (25th; 75th percentiles)]: E group: 28.50 (17.4; 41.20); C group: 15.15 (8.85; 26.45); *P* < 0.0001) (Fig. 2). The subanalysis of endometriosis patients with or without DIE showed that total cMP levels were statistically higher in the DIE group compared with the C group (*P* = 0.001), and no differences were found between the OE group and the C group ([median nM PS eq (25th; 75th percentiles)]: DIE group: 33.10 (20.28; 40.30); OE group: 24.80

(12.45; 41.80) and C group: 15.15 (8.85; 26.45)) (Fig. 3). The presence or absence of PE in the DIE and OE group did not alter these results (data not shown).

The subanalysis between the women with and without pelvic pain, regardless of endometriotic lesions did not show significant differences ([median nM PS eq (25th; 75th percentiles)]: no pelvic pain: 23.25 (13.55; 37.93); pelvic pain: 20.80 (10.64; 37.35)).

Among all patients with OE (*n* = 47), 27 patients (57.4%) had associated PE. Total cMP levels were statistically higher in patients with OE compared with endometriosis-free patients with ovarian cysts (*n* = 22) ([median nM PS eq (25th; 75th percentiles)]: patients with OE: 27.6 (16.50; 38.90); endometriosis-free patients with ovarian cysts: 13.7 (10.70; 29.2); *P* = 0.03), irrespective of whether OE was associated with PE or not (data not shown). The comparison of total cMP levels between OE patients and healthy women (patients who underwent tubal ligation) showed similar results (data not shown).

The comparison of follicular versus luteal phase did not show statistical differences in cMP levels ([median nM PS eq (25th; 75th percentiles)]: cMP follicular phase: 27.60 (11.33; 34.65); cMP luteal phase: 24.10 (16.60; 29.30)). The subanalysis of cMP levels among the groups analyzed showed no differences between the follicular and luteal phase (data not shown).

cMP-TF and sTF levels

There were no statistically significant differences in cMP-TF levels between the two groups analyzed [median pg/ml (25th; 75th percentiles)]: E group: 0.91 (0.73; 1.23); C group: 0.92 (0.69; 1.21) (Fig. 2). The subanalysis of endometriosis patients with or without DIE showed no statistically significant differences [median pg/ml (25th; 75th percentiles)]: DIE group: 0.91 (0.74; 1.26); OE group: 0.90 (0.69; 1.16); C group: 0.92 (0.69; 1.21) (Fig. 3).

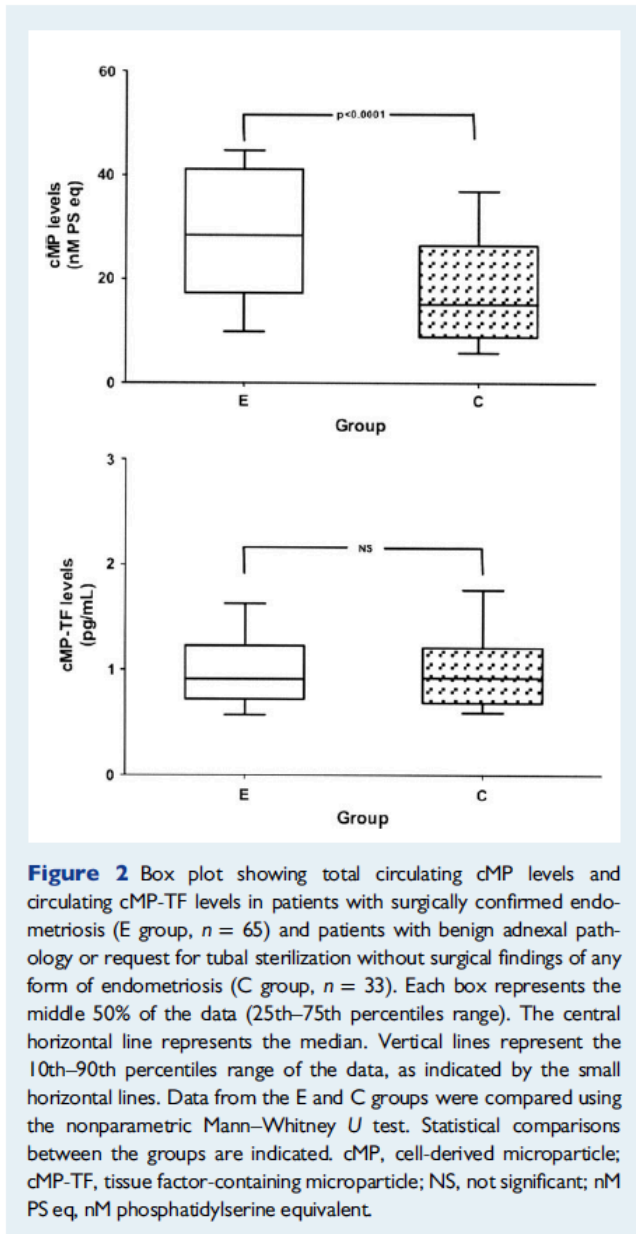
No differences in the cMP-TF levels were found between patients with and without pelvic pain, regardless of endometriotic lesions ([median pg/ml (25th; 75th percentiles)]: no pelvic pain: 0.91 (0.71; 1.22); pelvic pain: 1.00 (0.74; 1.25)).

The comparison of the cMP-TF levels between patients with OE (*n* = 47) compared with endometriosis-free patients with ovarian

Table 1 Clinical characteristics of the patients included in a study of circulating microparticles in endometriosis.

	E group (n = 65)	C group (n = 33)	P value
Age (years)	35 (31; 36)	32 (27; 38)	NS
BMI (kg/m ²)	21.68 (19.99; 24.30)	22.72 (20.70; 25.39)	NS
Tobacco use	25 (38.5%)	12 (36.4%)	NS
Dysmenorrhea VAS ≥ 7	44 (67.7%)	7 (21.2%)	<0.0001
Dyspareunia VAS ≥ 7	15 (23.1%)	3 (9.1%)	NS
Dyschezia VAS ≥ 7	14 (21.5%)	1 (3%)	0.017
Dysuria VAS ≥ 7	6 (9.2%)	1 (3%)	NS
Chronic pelvic pain VAS ≥ 7	14 (21.5%)	2 (6.1%)	NS
Hematuria	5 (7.7%)	0	NS
Rectal bleeding	5 (7.7%)	0	NS

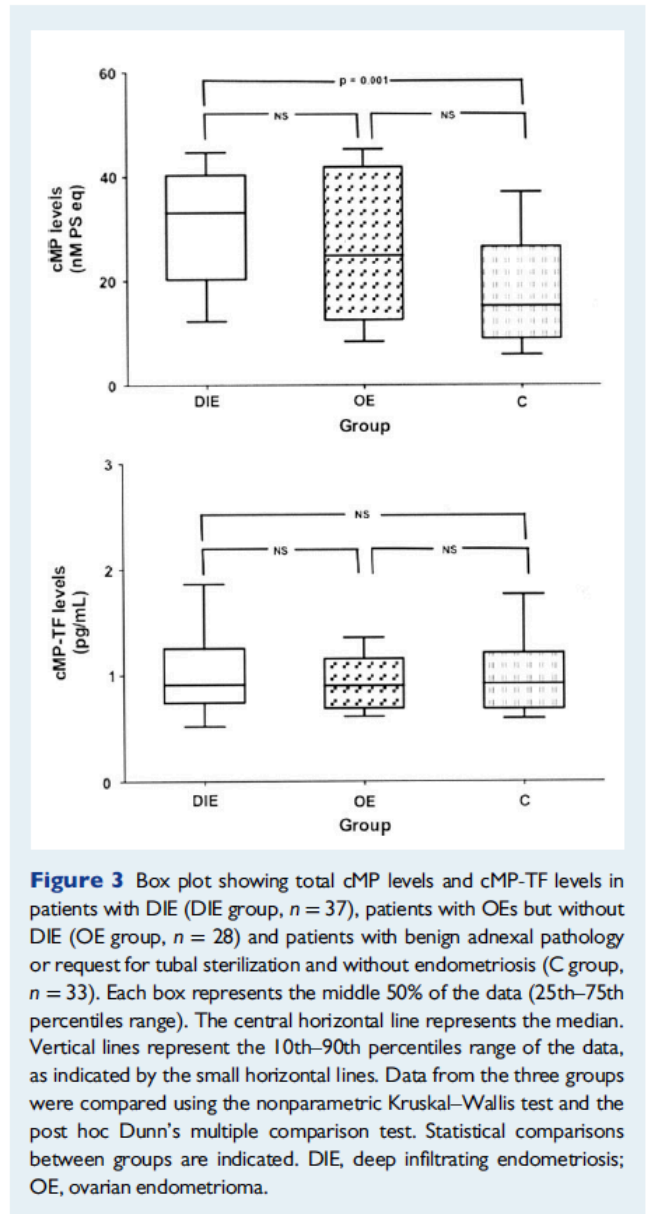
The values are median (25th; 75th percentiles) or *n* (%). NS, not significant; VAS, visual analog scale. E group = women with surgically confirmed DIE and/or OEs; C group = women with benign adnexal pathology or request for tubal sterilization without surgical findings of any form of endometriosis. Continuous variables were compared using the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Categorical variables were compared using the Chi-square test.



cysts ($n = 22$) showed no significant differences ([median pg/ml (25th; 75th percentiles)]: patients with OE: 0.90 (0.72; 1.17); endometriosis-free patients with ovarian cysts: 0.87 (0.63; 1.13)).

The cMP-TF levels were statistically similar in the follicular and luteal phase ([median pg/ml (25th; 75th percentiles)]: cMP-TF follicular phase: 0.85 (0.74; 1.07); cMP-TF luteal phase: 0.92 (0.76; 1.01)) and comparison among groups according the follicular or luteal phase showed no differences (data not shown).

There were no statistically significant differences in sTF levels between the two groups analyzed ([median pg/ml (25th; 75th percentiles)]: E group: 26.20 (21.60; 30.80); C group: 27.80 (23.90; 33.00)). The subanalysis of the DIE and OE groups showed no statistically significant differences ([median pg/ml (25th; 75th percentiles)]: OE group: 24.25 (19.50; 30.80); DIE group: 27.80 (22.60; 31.49); C group: 27.80 (23.90; 33.00)).



Discussion

The current investigation is a preliminary report to study functional cMP and cMP-TF levels in patients with endometriosis. Our study has shown increased total cMP but not cMP-TF levels in endometriosis patients. This notwithstanding, it should be stressed that these increased total cMP levels in endometriosis patients seem to be attributed to higher levels in DIE patients but not in patients with OE without DIE.

In the last two decades, the interest in cell-derived cMP has risen. Indeed, cMPs have been described to be involved in the processes of coagulation, inflammation, angiogenesis, cell remodeling and proliferation (Barteneva *et al.*, 2013) and have been implicated in several diseases associated with hypercoagulability, such as atherosclerosis, venous thromboembolism, sepsis and cancer (Piccin *et al.*, 2007). Nonetheless, elevated levels of cMP have also been reported in

inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, multiple sclerosis and Crohn's disease (Barteneva et al., 2013; Buzas et al., 2014).

In the last few years, there has been increasing evidence about the intimate interplay between inflammation and coagulation, which seem to interact by many mechanisms including cMP (Wu, 2015). It has been reported that platelets are activated and aggregated in endometriotic lesions contributing to angiogenesis, inflammation and evolution to fibrosis (Ding et al., 2015). Moreover, it has recently been suggested that endometriosis patients may be in a hypercoagulable state (Wu et al., 2015; Guo et al., 2015). Furthermore, it has been hypothesized that cyclic bleeding that takes place in endometriotic lesions may activate and aggregate platelets in these sites, inducing the production of cMP (Guo et al., 2015), which would contribute to the development of endometriosis by several mechanisms. The results of our preliminary study provide data showing higher levels of total cMP in endometriosis patients with DIE compared with endometriosis patients with OE without DIE and patients without endometriosis, reflecting the chronic inflammatory and/or pro-coagulant systemic status in these patients. The higher cMP levels found in the DIE patients in the subanalysis suggest that there may be a more intense grade of inflammation and angiogenesis in this more aggressive form of endometriosis. It remains unknown whether these cMP levels are causative, a consequence or a coincidence in DIE patients, as our research is preliminary. Nevertheless, our results suggest that cMP levels may have a role in the pathophysiological mechanisms of DIE, although the relationship between the severity and extension of DIE lesions and cMP levels cannot be ascertained from our preliminary study, and these issues remain to be established in larger further studies.

cMP-TFs are described to be involved in the coagulation activation process and higher plasma levels have been detected in cases of hypercoagulable states (van Es et al., 2015). Apart from their role in hemostasis, cMP-TFs have been described to be involved in inflammation, tumor progression and angiogenesis (Lin et al., 2012). It has been reported that women with endometriosis have an increased expression of TF in eutopic and ectopic endometrium-derived cells (Kikrun et al., 2009; Lin et al., 2012; Ding et al., 2015). However, according to our results, this fact does not correlate with plasma cMP-TF levels, since we found no differences in cMP-TF levels among the groups analyzed. Although no increase in cMP-TF levels was found in our series, these results do not rule out the hypothesis of a possible role of TF in endometriosis at a tissue/local level (Kikrun et al., 2009; Lin et al., 2012; Ding et al., 2015). In our study, we determined plasma cMP-TF levels in peripheral blood, as sTF plasma levels may not necessarily reflect the amount or function of TF located at the site of endometriosis lesions. Therefore, total cMP but not cMP-TF levels might be implied in the pathophysiology of DIE. Another possible explanation, as previously described by other authors (Key and Mackman, 2010; Hellum et al., 2012), is that the measurement of cMP-TF functional activity may be technically difficult in plasma with low levels of cMP-TF. Nevertheless, this hypothesis is less probable since we additionally determined sTF levels by ELISA obtaining concordant results with those of cMP-TF, with very low sTF levels in patients and no differences among groups.

Our study has several strengths. First is that all blood samples were obtained just before surgery in order to assess the basal plasma total cMP and cMP-TF levels of these patients. Second, all patients underwent surgery and were definitively classified into the study or control

groups according to the surgical findings and histology and not only according to the presurgical work-up.

On the other hand, the present study also has some limitations. First, the sample size was small and arbitrarily decided according to previous studies analyzing cMP in other inflammatory diseases (Giuducci et al., 2008; Leonetti et al., 2013) and biomarkers in endometriosis (Fassbender et al., 2013). Therefore, our research should be considered a preliminary study since there are no previous studies exploring the involvement of cMP in endometriosis patients. Second, we did not include a group of patients with isolated peritoneal lesions and therefore, since it has been reported that early endometriosis with red peritoneal lesions may induce a higher inflammatory response in the pelvic cavity than advanced endometriosis (Khan et al., 2004), this research cannot evaluate if DIE is associated with a higher degree of inflammation than peritoneal endometriosis. Another drawback of the current investigation is that the C group was composed of controls without endometriosis who underwent surgery for benign adnexal pathology or tubal sterilization to verify the absence of endometriosis lesions and therefore not all of them were healthy controls. The fact that we included patients in the C group without presurgical suspicion of endometriosis and not patients with endometriosis-like symptoms after laparoscopic and histological examinations showing no endometriosis may lead to an overestimation of diagnostic characteristics, and, therefore, our results may have more pathophysiological interest than diagnostic implications. Moreover, it should be noted that blood samples were obtained at different phases of the menstrual cycle, which could constitute a limitation owing to the potential for cMP concentrations to change over the menstrual cycle and the subanalysis of our data could be biased because of the small sample size. Finally, another limitation of our study is that, apart from the subset of cMP-TF, no other subtypes of cell-derived cMP were investigated, and we did not use other methodological approaches to determine cMP levels.

In conclusion, our preliminary study shows that DIE patients have increased functional cMP levels. These high total cMP levels in DIE patients were not found in either OE patients without DIE or in controls without endometriosis. The presence of elevated functional cMP levels in women with DIE may reflect an inflammatory and/or pro-coagulant systemic status in these patients. Nonetheless, further studies are warranted to confirm our findings and to assess the role of total cMP in the pathophysiological mechanisms of this disease. Further research should focus on analyzing cMP levels and other cMP subtypes in different types of endometriosis including peritoneal endometriosis and in different sites and extension of DIE lesions.

Authors' roles

J.M. has contributed to the study design, recruitment of patients, sample extraction and analysis, results analysis and wrote the manuscript. M.A.M.-Z. contributed to the study design, recruitment of patients, results analysis, manuscript preparation and critical discussion. D.T. contributed to the study design, sample analysis, results analysis, manuscript preparation and critical discussion. J.L.C. contributed to the recruitment of patients, sample extraction and results analysis. M.A.T., J.C.R., F.C. and J.B. contributed to the study design, results analysis, manuscript preparation and critical discussion.

Funding

This study was supported in part by a grant from FIS-PIII/01560 and FIS-PIII/00977 within the 'Plan Nacional de I+D+I' and co-funded by the 'ISCIII-Subdirección General de Evaluación' and 'Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)' and by the grant 'Premi Fi de Residència Emili Letang 2015' from the Hospital Clínic of Barcelona.

Conflict of interest

None declared.

References

- Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, Stern JN, Ponomarev ED, Duckett L, Vorobjev IA. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol* 2013;**14**:23.
- Bourdel N, Alves J, Pickering G, Ramilo I, Roman H, Canis M. Systematic review of endometriosis pain assessment: how to choose a scale? *Hum Reprod Update* 2015;**21**:136–152.
- Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009;**360**:268–279.
- Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;**98**:511–519.
- Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014;**10**:356–364.
- Chapron C, Santulli P, de Ziegler D, Noel JC, Anaf V, Streuli I, Foulot H, Souza C, Borghese B. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2012;**27**:702–711.
- Ding D, Liu X, Duan J, Guo SW. Platelets are an undicted culprit in the development of endometriosis: clinical and experimental evidence. *Hum Reprod* 2015;**30**:812–832.
- Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, Levobic D, Waelkens E, De Moor B, D'Hooghe T. *Fertil Steril* 2013;**99**:1135–1145.
- Giuducci S, Distler JH, Jünger A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, Gay RE, Pisetsky DS, Gay S, Matucci-Cerinic M et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:2845–2853.
- Guo SW, Ding D, Geng JG, Wang L, Liu X. P-selectin as a potential therapeutic target for endometriosis. *Fertil Steril* 2015;**103**:990–1000.
- Hellum M, Øvstebø R, Trøseid AM, Berg JP, Brandtzaeg P, Henriksson CE. Microparticle-associated tissue factor activity measured with the Zymuphen MP-TF kit and the calibrated automated thrombogram assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;**23**:520–526.
- Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Ishimaru T. Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum. *Fertil Steril* 2004;**81**:652–661.
- Key NS, Mackman N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. *Semin Thromb Hemost* 2010;**36**:865–875.
- Kikrun G, Lockwood CJ, Paidas MJ. Tissue factor and the endometrium: from physiology to pathology. *Thromb Res* 2009;**124**:393–396.
- Leonetti D, Reimund JM, Tesse A, Viennot S, Martinez MC, Bretagne AL, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from Crohn's disease patients cause endothelial and vascular dysfunctions. *PLoS One* 2013;**8**:e73088.
- Lin M, Weng H, Wang X, Zhou B, Yu P, Wang Y. The role of tissue factor and protease-activated receptor 2 in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2012;**68**:251–257.
- Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Creus M, Reverter JC, Puerto B, Monteagudo J, Carmona F, Balasch J. Higher levels of procoagulant microparticles in women with recurrent miscarriage are not associated with antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod* 2016a;**31**:46–52.
- Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Reverter JC, Creus M, Casals G, Cívico S, Carmona F, Balasch J. Increased circulating cell-derived microparticle count is associated with recurrent implantation failure after IVF and embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2016b;**33**:168–173.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007;**21**:157–171.
- Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic mechanisms of deep infiltrating endometriosis. *Reprod Sci* 2015;**22**:1053–1059.
- van Es N, Bleker S, Sturk A, Nieuwland R. Clinical significance of tissue factor-exposing microparticles in arterial and venous thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2015;**41**:718–727.
- Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014;**10**:261–275.
- Wu Q, Ding D, Liu X, Guo SW. Evidence for a hypercoagulable state in women with ovarian endometriomas. *Reprod Sci* 2015;**22**:1107–1114.
- Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb J* 2015;**13**:17.

4.2. ESTUDI 2

INCREASED CIRCULATING CELL-DERIVED MICROPARTICLE LEVELS IN DEEP INFILTRATING ENDOMETRIOSIS PATIENTS WITH LARGER IMPLANTS

Article publicat a ***Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders***

Munrós J, Tàssies D, Reverter JC, Carmona F, Martínez-Zamora MA.

J Endometr Pelvic Pain Disord. In press.



Increased circulating cell-derived microparticle levels in deep infiltrating endometriosis patients with larger implants

Journal of Endometriosis and
Pelvic Pain Disorders
1–9
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2284026519850432
journals.sagepub.com/home/pev
SAGE

Jordina Munrós^{1,2}, Dolors Tàssies³, Joan Carles Reverter³,
Francisco Carmona^{1,2} and María Ángeles Martínez-Zamora^{1,2} 

Abstract

Objective: Circulating cell-derived microparticles have been reported to be elevated in inflammatory and procoagulant conditions including deep infiltrating endometriosis. The objective of this pilot study was to investigate whether higher circulating cell-derived microparticle levels may be associated with specific clinical features and the extension or severity of deep infiltrating endometriosis.

Methods: This is an observational analytical cross-sectional study, including three groups of patients undergoing gynecological surgery. The DIE group included 75 patients with deep infiltrating endometriosis, the control group (C group) consisted of 39 patients without endometriosis, and a positive control group was composed of 31 patients with ovarian endometriomas but not deep infiltrating endometriosis (OE group). Venous blood samples for circulating cell-derived microparticle determinations in plasma were obtained before surgery. The following variables were assessed: severe dysmenorrhea, dyspareunia, non-cyclic chronic pelvic pain, dyschezia, dysuria, hematuria, rectal bleeding, sterility, presence of ovarian endometrioma, adenomyosis, and adhesions, rASRM (revised American Society for Reproductive Medicine) stage, Enzian classification, number of sites affected, and the cumulative size of deep infiltrating endometrial implants.

Results: Circulating cell-derived microparticle levels were statistically higher in the DIE group compared with the C group (p -value=0.001). None of the variables analyzed showed higher levels of circulating cell-derived microparticles in the DIE group, except for a significant positive correlation between the cumulative size of deep infiltrating endometrial lesions and circulating cell-derived microparticle levels ($r=0.264$, $p=0.022$).

Conclusion: Patients having deep infiltrating endometriosis with a larger cumulative size of endometriotic implants showed higher circulating cell-derived microparticle levels suggesting an increased inflammatory and/or hypercoagulable systemic status in this more severe form of the disease. Further research is needed to assess our findings and to explore the role of circulating cell-derived microparticles in the pathophysiology of deep infiltrating endometriosis.

Keywords

Circulating cell-derived microparticles, deep infiltrating endometriosis, dysmenorrhea, endometriosis, inflammation

Date received: 12 January 2019; accepted: 22 April 2019

Introduction

Endometriosis is an estrogen-dependent chronic inflammatory condition, the pathogenesis of which still remains unclear.^{1–3} Among the different subtypes of endometriosis, deep infiltrating endometriosis (DIE) is recognized as the most aggressive form. Women affected by DIE generally report worse pain symptoms and its management is complex and challenging.^{4–6} Nowadays, DIE may be considered as a specific entity since it presents specific pathogenic features in comparison to other endometriosis phenotypes.

¹Department of Gynaecology, Clinic Institute of Gynaecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain

²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

³Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain

Corresponding author:

María Ángeles Martínez-Zamora, Department of Gynaecology, Clinic Institute of Gynaecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain.

Email: mazamora@clinic.cat

Several immunological, hormonal, and inflammatory factors have been described.^{7,8}

New pathogenic mechanisms of endometriosis related to inflammation and coagulation pathways have recently been described. It has been hypothesized that patients with endometriosis could be in an inflammatory and hypercoagulable state.^{2,9,10} Higher levels of circulating cell-derived microparticles (cMP) have been observed in many inflammatory conditions, thrombotic diseases, and malignancy. cMP are small (100–1000 nm diameter) membrane-enclosed vesicles released from several types of eukaryotic cells due to mechanisms that include activation, apoptosis, and cell damage.¹¹ They have been described to be involved in blood coagulation, inflammation, angiogenesis, and cellular signaling and proliferation,^{11,12} and it is thought that they may also be involved in disease pathology.^{12,13} Furthermore, in a recent study by our research team, higher levels of cMP were observed in endometriosis patients, which seemed to be attributed to the subgroup of patients with DIE lesions.¹⁴ To our knowledge, it is not known whether any subgroup of patients with DIE shows increased cMP levels.

Notwithstanding, the aim of this preliminary study was to investigate whether higher cMP plasma levels are associated with specific clinical features of DIE or with the extension and/or severity of the disease.

Methods

Study design and subjects

This is an observational analytical cross-sectional study designed to investigate the levels of cMP in plasma of patients with surgically confirmed DIE (DIE group). Two control groups were included in this study: one with patients without surgical findings of endometriosis (C group), and the other was a positive control group composed of patients with surgically confirmed ovarian endometriomas (OE) but no findings of DIE (OE group).

For this study, 145 women were prospectively recruited during a 12-month period. The DIE group was composed of patients who underwent a surgical intervention due to clinical suspicion of DIE. Controls included the next woman without suspicion of endometriosis (C group) or with OE but without suspicion of DIE lesions (OE group), undergoing a surgical intervention after including two patients with DIE. The C group included patients with a planned laparoscopy due to benign tubal or ovarian pathology or a request for tubal sterilization with no pre-surgical suspicion of DIE. The OE group consisted of patients with suspicion of OE but no DIE after the pre-surgical evaluation. Patients were definitively assigned to one of the three groups after laparoscopy and histological study. Figure 1 shows the flowchart of patient inclusion and drop-out.

The inclusion criteria were women 18–40 years old with a body mass index < 30.00 kg/m². The exclusion criteria were as follows: history of neoplasms, endocrine, cardiovascular or systemic disorders, being pregnant or in lactational period 6 months before study recruitment, climacteric status, endometrial disorders, uterine fibroids, use of hormonal medication and intake of any treatment including painkillers 3 months before study recruitment (except for oral acetaminophen ≤ 72 h before sample collection), or having suffered from an inflammatory or infectious condition 6 months before study recruitment.

Clinical and epidemiological information was collected from all participants of the study, including age, body mass index, tobacco consumption, number of pregnancies, and sterility history (excluding male causes). Pain symptoms associated to endometriosis (during menstruation, sexual intercourse, during defecation and micturition, and also non-cyclic chronic pelvic pain) were registered and quantified according to the visual analog scale.¹⁵ Severe symptomatology was considered if participants reported a score ≥ 7.¹⁶ Hematuria or rectal bleeding was also recorded. An extensive preoperative evaluation was performed with a clinical examination and a gynecological ultrasound in all cases, and magnetic resonance imaging if necessary in case of clinical suspicion of DIE.⁶

All women included in the study underwent a laparoscopy by means of a 12-mm trocar placed in the umbilical port and two or three 5-mm trocars placed in the lower hemiabdomen. In all cases, pelvic structures and peritoneum were inspected before beginning the surgical procedure indicated in each case. All tissue excised was examined in the pathology laboratory to confirm or exclude endometriosis. Lesions obtained were classified as DIE when endometriosis tissue penetrating more than 5 mm under the peritoneal surface was observed.¹⁷ The size of each DIE lesion excised was defined according to its maximum diameter in the histological study.

As mentioned above, the DIE group was composed of 75 patients with laparoscopic and clinical findings of DIE lesions. The following DIE forms were recorded: vesical (*n* = 17), ureteral (*n* = 11), retrouterine (*n* = 40), retrocervical (*n* = 41), uterosacral ligaments (*n* = 46), fallopian tubes (*n* = 13), rectovaginal septum (*n* = 17), vaginal (*n* = 9), sigmoid (*n* = 36), and other intestinal location (*n* = 5). All DIE lesions were removed during laparoscopy. The description of endometriosis lesions was performed based on both the rASRM (revised American Society for Reproductive Medicine)¹⁸ score and the Enzian classification.¹⁹ The first assigns values to endometriosis lesions, which are classified into four stages of severity: stage I (minimal), stage II (mild), stage III (moderate), and stage IV (severe). In this study, seven patients were classified into stage I or II and 68 into stage III or IV. The Enzian classification divides DIE into three compartments based on the retroperitoneal

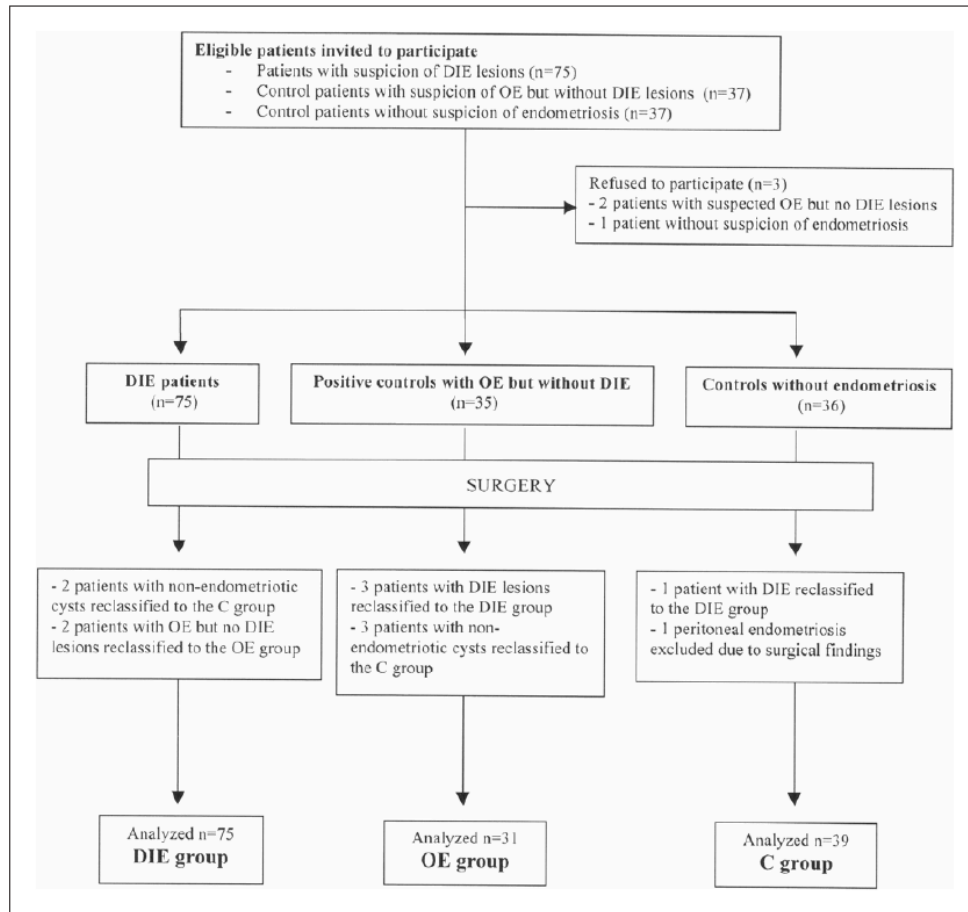


Figure 1. Flowchart of the inclusion and drop-out of patients included in this study (DIE group: patients with surgically confirmed deep infiltrating endometriosis (DIE); OE group: patients with surgically confirmed ovarian endometriomas (OE) but no findings of DIE; C group: women with benign tubal or ovarian pathology or request for tubal sterilization without surgical findings of any form of endometriosis).

structures involved: compartment A (rectovaginal septum and vagina), compartment B (sacrouterine ligament to pelvic wall), and compartment C (rectum and sigmoid colon). In this study, DIE lesions beyond these structures were defined as “other” compartments and included vesical, ureteral, or intestinal disease cranial to the rectosigmoid junction and other locations.¹⁹ The distribution of patients with the presence of DIE lesions in previously reported compartments was as follows: compartment A ($n=19$), compartment B ($n=67$), compartment C ($n=36$), and “other” compartments ($n=31$). $OE \geq 3$ cm were found in 52 patients, 37 were unilateral (14 on the right side and 23 on the left side), and 15 were bilateral. Among patients with DIE lesions, 55 were diagnosed with adenomyosis, which was detected during the presurgical evaluation by two- and three-dimensional transvaginal ultrasound examination according to specific features and previously reported criteria,²⁰ as well as with magnetic resonance imaging, if necessary.

The C group consisted of 39 patients undergoing surgery for benign tubal or ovarian pathology ($n=23$) or request for tubal sterilization ($n=16$). Surgery for benign pathology included unilateral ovarian cystectomy due to teratoma ($n=8$), paraovarian cyst ($n=2$), serous cystadenoma ($n=7$), and mucinous cystadenoma ($n=3$); bilateral cystectomy due to right teratoma and left serous cystadenoma ($n=1$); and unilateral adnexectomy due to teratoma ($n=1$) and ovarian fibroma ($n=1$).

The OE group included 31 patients undergoing laparoscopy for clinical suspicion of $OE \geq 3$ cm, but no DIE lesions were observed at surgical inspection. Among these, 20 were unilateral (8 on the right side and 12 on the left side) and 11 were bilateral.

Sample collection and analysis

Antecubital venous puncture before preanesthetic medication intake and anesthesia induction was performed to

obtain venous blood samples, which were collected in tubes containing 3.8% trisodium citrate (1/9, vol/vol; Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). Date of sample collection was recorded. All samples were obtained from patients after 10-h fast. Platelet-free plasma was aliquoted, snap-frozen in a mixture of dry ice/ethanol (1/2 vol/vol) and stored at -80°C after a double centrifugation, first at 2000 g for 10 min at 22°C and then at 5000 g for 10 min at 4°C . All samples were processed and stored within 2 h after they were obtained. No sample suffered freeze-thaw cycles since they were stored in small-volume aliquots. A single experienced operator, blind to the group allocation, performed all the assays. Samples were tested in duplicate and re-tested if discordant data were obtained. The mean absorbance values for each set of duplicate samples were calculated. There were no missing data or outliers.

cMP analysis

To assess cMP, we used a readily available commercial functional prothrombinase assay based on the property of annexin V to bind phosphatidylserine (PS) (ZYMUPHEN MP-ACTIVITY; HYPHEN BioMed, Neuville, France) as previously reported.^{14,21} Data obtained were shown as nanomolar PS equivalents (nM PS eq). The detection threshold of the assay is 0.05 nM.

Sample size and statistical analysis

This was a pilot study to evaluate the levels of cMP in patients with DIE. The sample size was decided based on the results of a previous study by our group analyzing cMP levels in patients with and without endometriosis, in which higher levels were found in the subgroup of patients with DIE lesions.¹⁴ According to these data, the minimum sample size calculated for this study was the following: 60 patients in the DIE group, 30 in the C group, and 30 in the OE group. This sample size was decided to achieve 80% of power level when applying the one-way analysis of variance (ANOVA) with 95% of confidence level.

The Statistical Package for the Social Sciences software, Release 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) was chosen for the statistical analysis. The parametric one-way ANOVA with the Bonferroni post hoc test was used for the comparison of continuous variables, presented as mean and standard deviations (SDs). The non-parametric Mann-Whitney *U* test for continuous variables was also used when appropriate, in which case data were presented as median with interquartile range (25th; 75th percentiles). For the analysis of categorical variables, the chi-square test was used and the data obtained were presented as total count and relative percentages. Correlation analysis between the cumulative size of DIE implants and cMP levels was performed by

means of Pearson *r* correlation. Statistical significance was defined as a *p*-value < 0.05 .

Results

Clinical characteristics of the participants

The clinical characteristics of the three groups included in this research work are shown in Table 1. The mean age, body mass index, and smoking habit were comparable in the three groups analyzed. As expected, DIE patients referred more severe dysmenorrhea, non-cyclic chronic pelvic pain, rectal bleeding, and sterility compared with the control groups.

In the DIE group, the localization and extension of lesions were definitively characterized during surgery, and a description of the different compartments involved is shown in Table 2, according to the Enzian classification.¹⁹

cMP levels

The analysis of the three groups included in the study showed that cMP levels were increased in the DIE group compared with the C group (*p*-value=0.001), and no differences were observed between the OE group and the C group or between the OE group and the DIE group (mean nM PS eq (\pm SD): DIE group: 28.50 (\pm 13.99); OE group: 25.32 (\pm 14.01) and C group: 18.40 (\pm 11.91)).

The subanalysis of cMP levels between the OE group (*n*=31) and patients in the DIE group with associated OE ≥ 3 cm (*n*=52) did not show significant differences (mean nM PS eq (\pm SD): OE group: 25.32 (\pm 14.01) and patients in the DIE group with associated OE ≥ 3 cm: 29.36 (\pm 14.21)).

Among patients with DIE lesions, the following clinical features and the extension and severity of the disease were studied to analyze whether there were differences in cMP levels: severe dysmenorrhea, dyspareunia, non-cyclic chronic pelvic pain, dyschezia and dysuria, hematuria and rectal bleeding, sterility, presence of adenomyosis, concomitant presence of OE, presence of adhesions, rASRM stage III or IV, compartments involved according to the Enzian classification (A, B, C, and "other"), number of sites affected by DIE lesions (1–3 sites or ≥ 3 sites),¹⁶ and the cumulative size of DIE implants in order to quantify the DIE tissue burden. Data were compared by means of the non-parametric Mann-Whitney *U* test and the correlation analysis between the cumulative size of DIE implants and cMP levels was performed by means of Pearson *r* correlation. None of the variables analyzed showed higher cMP levels among patients included in the DIE group (Table 3). Nevertheless, a significant positive correlation was observed between the cumulative size of DIE implants and cMP levels (*r*=0.264, *p*=0.022; Figure 2).

Table 1. Clinical characteristics of the patients included in the three groups analyzed.

	DIE group (n=75)	OE group (n=31)	C group (n=39)	p-value
Age (years)	34.40 ± 3.45	33.39 ± 3.58	32.18 ± 6.18	0.295
BMI (kg/m ²)	22.59 ± 2.80	22.33 ± 3.08	24.23 ± 4.18	0.137
Tobacco use	22 (29.3%)	15 (48.4%)	14 (35.9%)	0.173
Dysmenorrhea ≥ 7	62 (82.7%)	19 (61.3%)	8 (20.5%)	<0.0001
Dyspareunia ≥ 7	22 (29.3%)	7 (22.6%)	4 (10.3%)	0.070
NCCPP ≥ 7	53 (70.7%)	6 (19.4%)	3 (7.7%)	<0.0001
Dyschezia ≥ 7	15 (20%)	5 (16.1%)	2 (5.1%)	0.109
Dysuria ≥ 7	7 (9.3%)	0 (0%)	2 (5.1%)	0.184
Hematuria	8 (10.7%)	2 (6.5%)	0 (0%)	0.108
Rectal bleeding	10 (13.3%)	2 (6.5%)	0 (0%)	0.048
Sterility	46 (61.3%)	6 (19.4%)	5 (12.8%)	<0.0001
Previous pregnancies	15 (20%)	5 (16.1%)	25 (64.1%)	<0.0001

BMI: body mass index; NCCPP: non-cyclic chronic pelvic pain; SD: standard deviation.

Values are mean ± SD or n (%). Continuous variables were compared using the parametric one-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post hoc test and categorical variables were compared using the chi-square test.

DIE group: women with surgically confirmed deep infiltrating endometriosis (DIE); OE group: women with ovarian endometriomas (OE) but no DIE lesions; C group: women with benign tubal or ovarian pathology or request for tubal sterilization without surgical findings of any form of endometriosis.

Table 2. Clinical description of deep infiltrating endometriosis (DIE) nodules after pelvic surgery according to the Enzian classification (n=75).

	Compartment A (n=19)	Compartment B (n=67)	Compartment C (n=36)	Others (n=31)	Overall (n=75)
Number of DIE implants, n (%)					
1 implant	2 (10.5)	13 (19.4)	2 (5.6)	5 (16.1)	18 (24)
2 implants	3 (15.8)	12 (17.9)	6 (16.7)	3 (9.7)	14 (18.7)
3 implants	2 (10.5)	15 (22.4)	8 (22.2)	5 (16.1)	16 (21.3)
4 implants	2 (10.5)	11 (16.4)	4 (11.1)	6 (19.4)	11 (14.7)
5 or more implants	10 (52.6)	16 (23.9)	16 (44.4)	12 (38.7)	16 (21.3)
Size of the largest implant, n (%)					
<10 mm	0 (0)	3 (4.5)	1 (2.8)	1 (3.2)	3 (4)
≥10 mm	3 (15.8)	13 (19.4)	5 (13.9)	4 (12.9)	13 (17.3)
≥20 mm	4 (21.1)	14 (20.9)	8 (22.2)	6 (19.4)	16 (21.3)
≥30 mm	8 (42.1)	26 (38.8)	14 (38.9)	15 (48.4)	30 (40)
≥40 mm	1 (5.3)	3 (4.5)	2 (5.6)	2 (6.5)	3 (4)
≥50 mm	3 (15.8)	8 (11.9)	6 (16.7)	3 (9.7)	10 (13.3)

The Enzian classification divides DIE into three compartments based on the retroperitoneal structures involved: compartment A (rectovaginal septum and vagina), compartment B (sacrouterine ligament to pelvic wall), and compartment C (rectum and sigmoid colon). In this study, DIE lesions beyond these structures were defined as "other" compartments and included vesical, ureteral, or intestinal disease cranial to the rectosigmoid junction and other locations.

Discussion

This was a preliminary study to investigate a possible association between specific clinical features of DIE, the extension or severity of the disease, and cMP levels. The results show that a larger cumulative size of DIE lesions is associated with higher cMP levels.

Endometriosis has been defined as an estrogen-dependent chronic inflammatory condition.¹⁻³ Several mechanisms have been defined to support this conceptualization in the sites of ectopic lesion invasion, but increased

inflammatory factors have also been detected in peripheral blood samples,²² suggesting that endometriosis is not only a local inflammatory condition but also a chronic systemic inflammatory disorder.²³ The severity of DIE could be attributed to several specific pathogenetic features, such as a higher grade of inflammatory mechanisms, compared with other endometriosis phenotypes.⁷ Moreover, there is increasing evidence that platelets and several coagulation mechanisms may be involved in the development of this gynecologic condition. In fact, it has recently been postulated that the activation and

Table 3. Circulating cell-derived microparticle (cMP) levels (nM PS eq) and number and percentage of patients with surgically confirmed deep infiltrating endometriosis (DIE) (DIE group, $n = 75$) with the presence or absence of the different variables analyzed.

	cMP levels	
	Variable presence	Variable absence
Dysmenorrhea ≥ 7	27.45 (18.23; 41.05)	25.60 (13.35; 32.90)
n (%)	62 (82.7)	13 (17.3)
Dyspareunia ≥ 7	25.50 (15.35; 41.40)	27.30 (17.85; 38.20)
n (%)	22 (29.3)	53 (70.7)
NCCPP ≥ 7	25.60 (17.70; 39.35)	27.90 (15.10; 40.30)
n (%)	53 (70.7)	22 (29.3)
Dyschezia ≥ 7	23.00 (19.40; 41.40)	27.45 (16.35; 39.20)
n (%)	13 (17.3)	62 (82.7)
Dysuria ≥ 7	34.70 (22.50; 39.30)	25.25 (16.73; 38.60)
n (%)	7 (9.3)	68 (90.7)
Hematuria	19.85 (14.93; 38.83)	27.60 (18.30; 39.80)
n (%)	8 (10.7)	67 (89.3)
Rectal bleeding	31.05 (19.95; 43.40)	25.30 (16.95; 39.35)
n (%)	10 (13.3)	65 (86.6)
Sterility	27.80 (17.40; 39.93)	24.80 (17.25; 39.35)
n (%)	46 (61.3)	29 (38.7)
Adenomyosis	27.30 (17.70-36.10)	30.40 (16.58; 42.10)
n (%)	57 (76)	18 (24)
OE	27.45 (19.75; 39.53)	21.70 (14.00; 41.60)
n (%)	52 (69.3)	23 (30.7)
Adhesions	25.60 (17.40; 39.75)	35.85 (15.67; 41.18)
n (%)	69 (92)	6 (8)
III or IV rASRM stage	25.45 (17.63; 39.78)	31.60 (12.70; 41.00)
n (%)	68 (90.7)	7 (9.3)
Enzian A compartment ^a	27.30 (15.80; 40.00)	26.60 (18.95; 39.78)
n (%)	19 (25.3)	56 (74.7)
Enzian B compartment ^a	27.60 (17.40; 40.00)	23.45 (15.08; 34.00)
n (%)	67 (89.4)	8 (10.7)
Enzian C compartment ^a	26.45 (16.73; 39.53)	28.00 (18.00; 41.00)
n (%)	36 (48)	39 (52)
"Other" compartments ^a	33.10 (20.20; 39.90)	23.90 (16.73; 38.25)
n (%)	31 (41.3)	44 (58.7)
≥ 3 sites affected	28.00 (18.30; 39.80)	25.00 (16.28; 39.68)
n (%)	43 (57.3)	32 (42.7)

NCCPP: non-cyclic chronic pelvic pain; OE: ovarian endometrioma; rASRM: revised American Society for Reproductive Medicine.

Data were compared using the non-parametric Mann-Whitney U test. None of the variables analyzed showed significant differences in terms of cMP levels.

cMP levels (nM PS eq) are expressed as median (25th; 75th percentiles). The number of patients is expressed as n (%).

^aThe Enzian classification divides DIE into three compartments based on the retroperitoneal structures involved: compartment A (rectovaginal septum and vagina), compartment B (sacrouterine ligament to pelvic wall), and compartment C (rectum and sigmoid colon). In this study, DIE lesions beyond these structures were defined as "other" compartments and included vesical, ureteral, or intestinal disease cranial to the rectosigmoid junction and other locations.

aggregation of platelets may take place in endometriotic implants contributing to angiogenesis, inflammation, and fibrosis.²⁴ Furthermore, Guo et al.¹⁰ have described the implication of P-selectin-mediated platelet adhesion in the development of endometriosis. In addition, a hypercoagulable state has also been associated with patients with endometriosis.⁹ Similarly, data obtained from a previous study by our group showed higher levels of cMP in endometriosis patients with DIE lesions compared with

endometriosis patients with OE without DIE and patients without surgically confirmed endometriosis.¹⁴

Once thought to be independent of each other, inflammation and coagulation are two ancestral systems that may interact through many mechanisms such as platelets, cMP, and other biological pathways.^{11,25,26} Having long been considered cellular debris, in the last two decades, cMP have been reported to play a role in the coagulation, inflammation, angiogenesis, cell remodeling, and proliferation

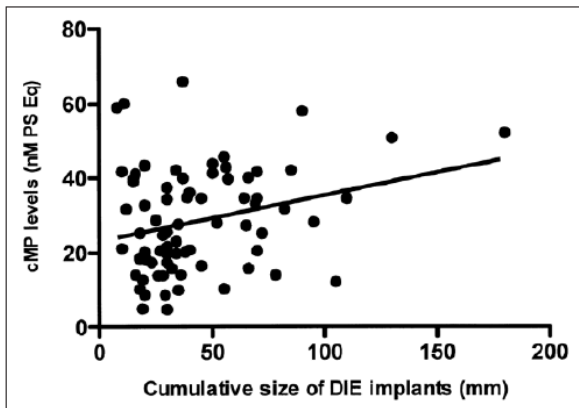


Figure 2. Correlation between cumulative size of deep infiltrating endometriosis (DIE) implants (mm) and circulating cell-derived microparticle (cMP) levels (nM PS eq). Pearson r correlation analysis showed a significant positive correlation ($r=0.264$; $p=0.022$).

processes^{11,12} occurring in a variety of pathophysiologic conditions.¹³ In fact, cMP have been reported to be involved in several inflammatory and procoagulant disorders, such as autoimmune diseases, cancer, venous thromboembolism, and sepsis.¹¹ The increased cMP levels found in the subgroup of DIE patients in this study might reflect a higher grade of inflammation in this more severe form of the disease and suggest that cMP might be involved in its pathogenesis.

The data obtained in this study are consistent with previous study results by our group and showed higher cMP levels in patients with DIE lesions.¹⁴ Moreover, within this group of patients, the larger the DIE tissue burden, the higher the cMP levels, with a significant positive correlation. No other clinical features which might be related to the severity of the disease, such as pain, sterility, extension of the disease, or different anatomical sites affected by DIE lesions, showed increased cMP levels. Similar data have been obtained in studies on cMP levels and malignancy, correlating increased cMP levels with larger tumor burden in hepatocellular carcinoma²⁷ and breast cancer.²⁸ According to these authors, these data may be related to tissue activation and cancer progression, and may reflect procoagulant changes during tumor development. Similarly, we found that a larger cumulative size of DIE implants is associated with increased cMP levels, and thus a higher inflammatory and/or hypercoagulable systemic status may be present in this subgroup of patients with a more severe form of the disease. The role of cMP in the pathophysiology of DIE should be explored in future studies in order to assess their usefulness as a possible therapeutic target for novel drugs against endometriosis and, specifically, against DIE. As it has been mentioned above, patients with endometriosis could be in an inflammatory and hypercoagulable state and cMP might contribute to

these facts. Thus, a reduction of their levels could contribute to stabilization or diminish progression of DIE lesions. Apart from this, it has been shown in this study that cMP might be useful to discriminate the presence of DIE lesions in patients with endometriosis suspicion and, among them, the severity in terms of disease burden. For this reason, the authors consider that future studies should also explore their potential as biomarkers of DIE presence in patients with endometriosis. If this fact was confirmed, it would help both clinicians and patients in the diagnostic procedure, clinical management, and surgical planning.

Our study has several strengths. First, this is an observational analytical cross-sectional study, where three groups of patients were included. Apart from a control group of women without endometriosis, we included another control group composed of patients with OE but without DIE lesions, and the study group included patients with DIE, since it may have a different physiopathology compared with other endometriosis phenotypes.⁷ Moreover, all patients in the study were definitively classified into one of the three groups following surgery, according to the surgical findings and histological study and not only to clinical suspicion and the presurgical evaluation.²⁹ Finally, blood samples from patients were obtained before surgery to guarantee that plasma cMP levels would reflect their basal status.³⁰

Nevertheless, this study also has some potential limitations. First, to date, only one previous pilot study about cMP levels in endometriosis has been reported and, therefore, the sample size was calculated based on this work by our group.¹⁵ Second, another weakness of our research work is that cMP were measured by capture on annexin V, which binds to PS. This is the most used molecule to evaluate the presence and levels of cMP. Nonetheless, no other techniques were used to assess cMP levels and no other subtypes of cMP were investigated. Finally, not all control patients included in the C group were completely healthy, since this group included women without endometriosis who underwent surgery for benign tubal or ovarian pathology.

In conclusion, data obtained in this pilot study show that DIE patients have higher cMP levels, which were not observed in either patients with OE but without DIE lesions or in women without endometriosis. Among DIE patients, a larger cumulative size of endometriotic lesions and no other specific clinical features nor the extension of the disease were associated with higher cMP levels. This might reflect an increased inflammatory and/or hypercoagulable systemic status in this subgroup of patients with a more severe form of the disease. Nevertheless, more investigations are needed to assess our findings and to explore the implication of cMP in the pathophysiology of DIE.

Author contributions

J.M. contributed to the study concept and design, performed acquisition, analysis, and interpretation of data, drafted the

article, and approved the version to be published. D.T. contributed to the study concept and design, performed acquisition, analysis, and interpretation of data, revised the article critically for important intellectual content, and approved the version to be published. J.C.R. and F.C. contributed to the study concept and design, interpreted the data, revised the article critically for important intellectual content, and approved the version to be published. M.A.M.-Z. contributed to the study concept and design, performed acquisition, analysis, and interpretation of data, revised the article critically for important intellectual content, and approved the version to be published.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethical approval

Ethical approval for this study was obtained from the Ethics Committee of Hospital Clinic of Barcelona (approval no. HCB/2015/0478).

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported in part by grant from FIS-PI11/01560 and FIS-PI11/00977 within the "Plan Nacional de I+D+I" and co-funded by the "ISCIII-Subdirección General de Evaluación" and "Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)" and by the grant "Premi Fi de Residència Emili Letang 2015" from Hospital Clinic of Barcelona.


Informed consent

Written informed consent was obtained from the patients for their anonymized information to be published in this article.

Trial registration

Trial registration is not applicable because this study is not a clinical trial.

ORCID iD

María Ángeles Martínez-Zamora  <https://orcid.org/0000-0002-8917-540X>

References

- Giudice LC and Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364: 1789–1799.
- Reis FM, Petraglia F and Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum Reprod Update* 2013; 19(4): 406–418.
- Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10: 261–275.
- Vercellini P, Frontino G, Pietropaolo G, et al. Deep endometriosis: definition, pathogenesis, and clinical management. *J Am Assoc Gyn Lap* 2004; 11(2): 153–161.
- Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009; 360: 268–279.
- Martínez-Zamora MA, Mattioli L, Parera J, et al. Increased levels of dioxin-like substances in adipose tissue in patients with deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2015; 30(5): 1059–1068.
- Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, et al. Pathogenetic mechanisms of deep infiltrating endometriosis. *Reprod Sci* 2015; 22(9): 1053–1059.
- Donnez J. Introduction: from pathogenesis to therapy, deep endometriosis remains a source of controversy. *Fertil Steril* 2017; 108(6): 869–871.
- Wu Q, Ding D, Liu X, et al. Evidence for a hypercoagulable state in women with ovarian endometriomas. *Reprod Sci* 2015; 22(9): 1107–1114.
- Guo SW, Ding D, Geng JG, et al. P-selectin as a potential therapeutic target for endometriosis. *Fertil Steril* 2015; 103(4): 990–1000.
- Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(6): 356–364.
- Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol* 2013; 14: 23.
- Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1655–1662.
- Munros J, Martínez-Zamora MA, Tassies D, et al. Total circulating microparticle levels are increased in patients with deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2017; 32(2): 325–331.
- Bourdel N, Alves J, Pickering G, et al. Systematic review of endometriosis pain assessment: how to choose a scale? *Hum Reprod Update* 2015; 21(1): 136–152.
- Chapron C, Santulli P, deZiegler D, et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27(3): 702–711.
- Nisolle M and Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68(4): 585–596.
- American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67: 817–821.
- Haas D, Oppelt P, Shebl O, et al. Enzian classification: does it correlate with clinical symptoms and the rASRM score? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013; 92: 562–566.
- Van den Bosch T, Dueholm M, Leone FP, et al. Terms, definitions and measurements to describe sonographic features of myometrium and uterine masses: a consensus opinion from the Morphological Uterus Sonographic Assessment (MUSA) group. *Ultrasound Obst Gyn* 2015; 46(3): 284–298.
- Martínez-Zamora MA, Tassies D, Creus M, et al. Higher levels of procoagulant microparticles in women with recurrent miscarriage are not associated with antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod* 2016; 31: 46–52.

22. Carmona F, Chapron C, Martínez-Zamora MA, et al. Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6. *J Reprod Immunol* 2012; 95: 80–86.
23. Kvaskoff M, Mu F, Terry KL, et al. Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases? *Hum Reprod Update* 2015; 21(4): 500–516.
24. Ding D, Liu X, Duan J, et al. Platelets are an undiagnosed culprit in the development of endometriosis: clinical and experimental evidence. *Hum Reprod* 2015; 30(4): 812–832.
25. Jenne CN and Kubes P. Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 2015; 26: 286–292.
26. Franco AT, Corken A and Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* 2015; 126(5): 582–588.
27. Wang W, Li H, Zhou Y, et al. Peripheral blood microvesicles are potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark* 2013; 13(5): 351–357.
28. Toth B, Nieuwland R, Liebhardt S, et al. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers. *Anticancer Res* 2008; 28(2A): 1107–1112.
29. Becker CM, Laufer MR, Stratton P, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil Steril* 2014; 102: 1213–1222.
30. Rahmioglu N, Fassbender A, Vitonis AF, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation project: III. Fluid biospecimen collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil Steril* 2014; 102: 1233–1243.

4.3. ESTUDI 3

CIRCULATING NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS ARE ELEVATED IN PATIENTS WITH DEEP INFILTRATING ENDOMETRIOSIS

Article publicat a ***Reproductive Sciences***

Munrós J, Tàssies D, Reverter JC, Martin L, Pérez A, Carmona F, Martínez-Zamora MA.

Reprod Sci. 2019 Jan;26(1):70-76.

doi: 10.1177/1933719118757682. Epub 2018 Feb 15.

Factor d'impacte: 2.548

2n quartil (Obstetrícia i Ginecologia)



Circulating Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients With Deep Infiltrating Endometriosis

Reproductive Sciences
1-7
© The Author(s) 2018
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1933719118757682
journals.sagepub.com/home/rsx

Jordina Munrós, MD¹, Dolors Tàssies, MD, PhD²,
Joan Carles Reverter, MD, PhD², Lidia Martín, MLA², Amelia Pérez, BScN¹,
Francisco Carmona, MD, PhD¹, and María Ángeles Martínez-Zamora, MD, PhD¹

Abstract

Neutrophil extracellular traps (NETs) have been described to be related to the pathogenesis of inflammatory and autoimmune conditions. Endometriosis is currently considered a chronic inflammatory condition. Therefore, we performed a preliminary case-control study to compare the circulating plasma NET levels in patients with surgically confirmed endometriosis (E group, n = 82) and those of patients without surgical findings of endometriosis (C group, n = 35). Venous blood samples were obtained at the time of surgery. Circulating plasma NET levels were assessed as histone-DNA complexes (ie, nucleosomes) by a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. The results were expressed in arbitrary units. Circulating plasma NET levels were significantly higher in the E group compared with the C group (median [25th; 75th percentiles]): E group: 0.734 [0.484; 1.363]; C group: 0.541 [0.411; 0.653]; $P = .005$). The subanalysis of E group patients with deep infiltrating endometriosis (DIE group) or without DIE (non-DIE group) showed that plasma NET levels were higher in the DIE group ($P = .02$). No differences were observed in NET levels among patients with and without severe pelvic pain or in patients with and without infertility, regardless of the presence of endometriotic lesions. Therefore, our study shows significantly higher NET levels in patients with endometriosis, which seem to be attributed to increased levels in the subgroup of patients with DIE, suggesting that the presence of elevated circulating plasma NET levels may reflect an inflammatory status in this gynecological condition. Further research is warranted to confirm our findings and to assess the exact role of NETs in the pathophysiological mechanisms of endometriosis.

Keywords

endometriosis, deep infiltrating endometriosis, neutrophil extracellular traps (NETs), inflammation

Introduction

Endometriosis is a benign gynecological disorder defined by the presence of hormonally responsive endometrial tissue outside the uterine cavity. Nonetheless, the pathogenesis of endometriosis is still under debate, and several theories have been proposed.¹ Several phenomena have been described to contribute to the pathophysiology of endometriosis, such as regulation of apoptosis, recruitment of immune cells in the endometriosis lesions, and development of neuroangiogenesis and vasculogenesis^{2,3} by means of many molecular and cellular alterations, which seem to be hormonally modulated.¹ Therefore, endometriosis is currently considered an estrogen-dependent chronic inflammatory disease.^{3,4}

Although the association of endometriosis and inflammation was first described at the beginning of the 20th century, most of the known cellular and molecular mechanisms involved have not been reported until the last few decades.¹⁻³ A local inflammatory milieu due to an overproduction of chemokines,⁵ prostaglandins, and recruitment of immune cells to endometriosis

sites, especially activated macrophages, natural killer cells, and neutrophils, has been described.^{1,5,6} However, the role of neutrophils in the biology of endometriosis has not been clearly defined.⁷ Neutrophils are considered to be part of the innate immune system and they act as a first-line host defense by phagocytosis and intracellular killing. However, in the past decade, another mechanism has been described, which consists

¹ Department of Gynaecology, Institut Clínic of Gynaecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clínic of Barcelona—Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine, University of Barcelona, Villarroel, 170, Barcelona, Spain

² Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic of Barcelona, Villarroel, 170, Barcelona, Spain

Corresponding Author:

María Ángeles Martínez-Zamora, Department of Gynaecology, Institut Clínic of Gynecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clínic of Barcelona, Villarroel 17008036, Barcelona, Spain.
Email: mazamora@clinic.cat

in extracellular killing by means of neutrophil extracellular traps (NETs). Neutrophil extracellular traps are defined as decondensed chromatin web-like structures comprised of extracellular DNA, histones, and granular proteins such as myeloperoxidase (MPO), expelled from neutrophils as a microbial defense mechanism, acting to trap and degrade microorganisms.^{8,9} Apart from their important role in host defense, in the last few years, NETs have been described to be involved in other functions of innate and adaptive immunity, which could be related to the pathogenesis of autoimmune and inflammatory conditions. Elevated NET levels have been associated with hypercoagulability and inflammatory diseases such as cystic fibrosis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, chronic obstructive pulmonary disease, psoriasis, and atherosclerosis,^{9,10-12} suggesting a role for NETs in the amplification and perpetuation of inflammation.

A recent study has described elevated NET levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis, concluding that NETs may be involved in its pathophysiology.⁷ Nevertheless, there are no previous studies evaluating the plasma NET content in patients with endometriosis. Therefore, the aim of this preliminary study was to determine the *in vivo* amount of circulating plasma NETs in patients with endometriosis.

Materials and Methods

Study Design and Participants

This was a prospective case-control study designed to evaluate circulating plasma NET levels in patients with surgically confirmed endometriosis. The study was approved by the ethics committee of Hospital Clinic of Barcelona (approval number: HCB/2015/0478), and informed consent was obtained from all the participants.

Participants were prospectively recruited during the same 12-month period. The endometriosis group (E group) consisted of patients who underwent surgery due to painful symptoms and imaging testing (gynecological ultrasonography and/or magnetic resonance imaging) with suspicion of endometriosis, which was confirmed by histopathologic study. The control group (C group) comprised the next patient without endometriosis undergoing surgery after including 2 patients with endometriosis. The C group included patients who underwent laparoscopy due to mild benign adnexal pathology (cystectomy, adnexectomy, or tubal sterilization) without presurgical suspicion of endometriosis and without endometriosis or signs of an inflammatory pelvic condition during surgery.

The inclusion criteria were as follows: women aged between 18 and 40 years and body mass index (BMI) <30.00 kg/m². The exclusion criteria were as follows: history of past or present malignancy; endocrine, cardiovascular, and systemic diseases; pregnancy or breastfeeding ≤6 months before sample collection; premature ovarian failure or menopausal status; use of hormone contraception or other hormone treatments and intake of any medication including anti-

inflammatory drugs ≤3 months before sample collection (except for oral acetaminophen as a painkiller ≤72 hours before sample collection); or having had an inflammatory disease or infectious condition ≤6 months before sample collection.

Clinical and epidemiological data were collected from all the individuals participating in the study, including age, BMI, smoking status, number of pregnancies, and infertility history (excluding male cases). Severe pelvic pain (visual analog scale score ≥7)¹³ was also recorded since NETs may be involved in inflammatory conditions.

Operative laparoscopy was performed in all patients by insertion of a 12-mm umbilical trocar and two or three 5-mm trocars in the lower abdomen. An inspection of the pelvic organs and peritoneum was performed followed by the surgical procedure indicated in each case. All tissue excised was sent for pathology examination to confirm or exclude endometriosis. Patients were definitively assigned to one of the 2 groups of patients after undergoing laparoscopy and histological study. Figure 1 shows the flowchart of patient inclusion and dropout. Initially, 80 patients suspected of endometriosis were invited to participate and the control group comprised the next patient without suspicion of endometriosis undergoing surgery after including 2 patients with suspected endometriosis (n = 40). Three patients did not accept to participate in the study (1 patient with suspicion of endometriosis and 2 controls without suspicion of endometriosis) and 5 patients were reclassified after surgery (1 patient was reclassified from the E group to C group due to a surgical finding of nonendometriotic cyst and 4 patients without suspicion of endometriosis were reclassified to the E group due to surgical findings of endometriosis), and thus, 82 patients with surgically confirmed endometriosis (E group) and 35 controls without endometriosis were finally included in the study.

Among the 82 patients included in the E group, deep infiltrating endometriosis (DIE) lesions were found in 65 patients (DIE group). The following DIE forms were recorded: vesical (n = 11), ureteral (n = 12), retrouterine (n = 32), fallopian tubes (n = 9), retrocervical (n = 29), uterosacral ligaments (n = 35), sigmoid (n = 17), rectovaginal septum (n = 11), other intestinal location (n = 4), and vaginal (n = 5). All DIE implants were excised during surgery. Ovarian endometriomas (OEs) were found in 47 patients; of these, 17 did not have DIE lesions (non-DIE group). Superficial peritoneal endometriosis was recorded in 72.3% of patients with DIE lesions and 41.2% of patients without DIE lesions.

The C group was composed of 35 patients undergoing surgery for benign adnexal pathology (n = 23) or request for tubal sterilization (n = 12). Patients undergoing surgery for benign adnexal pathology included unilateral ovarian cystectomy due to dermoid cyst (n = 8), paraovarian cyst (n = 2), serous cystadenoma (n = 7), mucinous cystadenoma (n = 3), bilateral cystectomy due to right dermoid cyst and left serous cystadenoma (n = 1), unilateral adnexectomy due to dermoid cyst (n = 1), and ovarian fibroma (n = 1).

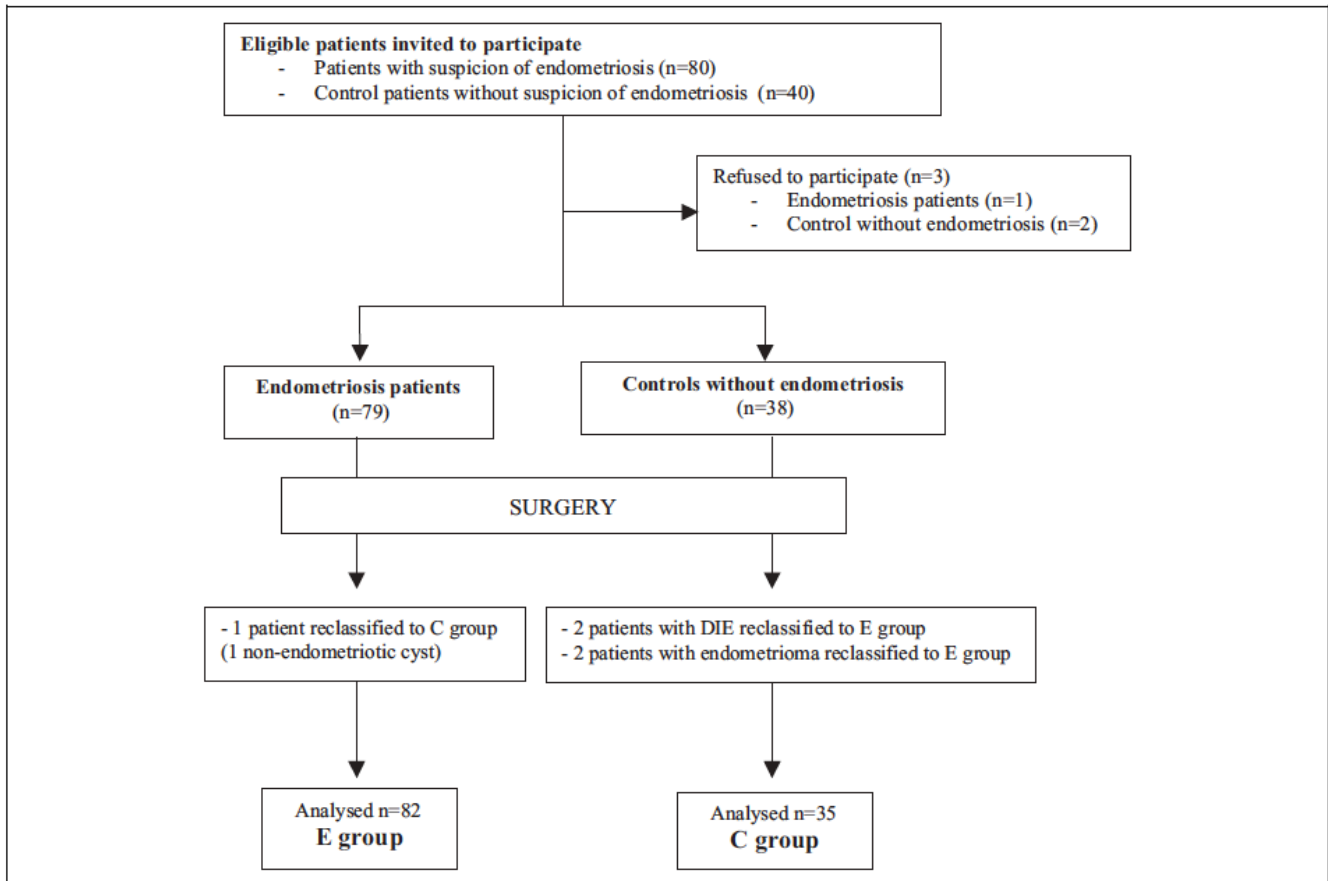


Figure 1. Flowchart of the inclusion and dropout of patients included in this study (E group: patients with surgically confirmed endometriosis; C group: women with benign adnexal pathology or request for tubal sterilization without surgical findings of any form of endometriosis). DIE indicates deep infiltrating endometriosis.

Sample Collection and Analysis

Before preanesthetic medication administration and anesthetic induction, venous blood samples were all collected by antecubital venous puncture in tubes containing 3.8% trisodium citrate (1/9 vol/vol; Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey), and platelet-free plasma was immediately obtained by double centrifugation, first at 2000g for 10 minutes at 22°C and then at 5000g for 10 minutes at 4°C. Plasma was aliquoted, snap-frozen in a mixture of dry ice/ethanol (1/2 vol/vol), and stored at -80°C. All the assays were done by a single experienced operator, who was blinded to the group allocation.

The menstrual phase in which the blood sample was taken in each patient was defined as the luteal phase if taken during the 14 days prior to the next planned menstruation and as the follicular phase during all the other days. No sampling was done during menstruation. In case of irregular menstrual cycles, a gynecological ultrasonography was performed to assess the presence of corpus luteum.¹⁴ Samples were obtained in the follicular and luteal phases in 58% and 42%, respectively, of patients in the E group and in 62% and 38%, respectively, in the C group.

Quantification of Circulating Plasma NETS

Circulating *in vivo* NETs were evaluated by the measurement of levels of nucleosomes (histone-DNA complexes) in plasma. We used a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using mouse monoclonal antibodies against DNA and histones, respectively (Cell Death ELISA Plus; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), which allows the specific determination of mono- and oligonucleosomes. Briefly, plasma samples are placed into a streptavidin-coated microtiter plate. A mixture of anti-histone-biotin and anti-DNA-peroxidase antibodies is added and incubated. During the incubation period, the anti-histone antibody binds to the histone component of the nucleosomes (histones H1, H2A, H2B, H3, and H4) and simultaneously captures the immunocomplex to the streptavidin-coated microplate via its biotinylation. Additionally, the anti-DNA-peroxidase antibody reacts with the DNA component of the nucleosomes. After removal of unbound antibodies by a washing step, quantitative determination of the amount of nucleosomes is determined by the addition of 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt substrate. The resulting color

development, which is proportional to the amount of nucleosomes captured in the antibody sandwich, is measured photometrically at 405 nm in an espcrophotometer (Multiskan Ascent; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Appropriate positive and negative controls supplied by the manufacturer were used in each run.

Results are expressed as a ratio between mU of patient/mU negative control, being $mU = \text{absorbance} [10E-3]$, and arbitrary units are used.

Samples were tested in duplicate. The mean absorbance values for each set of duplicate samples were calculated. Experiments were performed by a single operator with lengthy experience in laboratory technique and who was blinded to the group allocation. The intra-assay coefficient of variation (CV) was 4.6%, and the interassay CV was 10.3%.

Sample Size and Statistical Analysis

This is a preliminary study to investigate the levels of circulating NETs in plasma of patients with endometriosis with an arbitrarily decided sample size, based on previous studies analyzing NETs in endometriosis and other inflammatory diseases.^{7,15,16} Statistical analysis was performed with the Statistical Package for the Social Sciences software, release 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, Illinois). Continuous variables were compared using the nonparametric Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test using the post hoc Dunn multiple comparison test, when appropriate, and presented as median with interquartile range (25th; 75th percentiles). Categorical variables were compared using the χ^2 and presented as total count and relative percentages (%). Statistical significance was defined as a *P* value <.05.

Results

Clinical Characteristics of the Participants

The baseline clinical characteristics of the 2 groups of patients included in the study are shown in Table 1. The median age, BMI, and tobacco use were similar in both groups. As expected, the percentage of patients with infertility (E group $n = 43$ [52%], C group $n = 4$ [11%]; $P < .001$) and with severe pelvic pain (E group $n = 51$ [62.2%], C group $n = 4$ [11.4%]; $P = .001$) was significantly higher in the E group compared with the C group and, to the contrary, the number of pregnancies was higher in the C group.

Circulating Plasma NET Levels

Circulating NET levels were significantly higher in the E group compared with the C group (median [25th; 75th percentiles]: E group: 0.734 [0.484; 1.363] and C group: 0.541 [0.411; 0.653]; $P = .005$; Table 2 and Figure 2). The results were similar when comparing patients of the C group without adnexal pathology (ie, healthy patients who underwent tubal sterilization) with the E group.

Table 1. Clinical Characteristics of the Patients Included in the 2 Groups Analyzed.^a

	E Group (n = 82)	C Group (n = 35)	P-Value
Age (years)	35 (32; 37)	31.5 (27; 38)	NS
BMI (kg/m ²)	22.30 (20.00; 24.52)	22.79 (20.64; 25.71)	NS
Tobacco use	28 (34%)	11 (31%)	NS
Infertility history	43 (52%)	4 (11%)	<.001
Number of pregnancies			
0	57 (69.5%)	10 (28.6%)	<.001
1	18 (22%)	8 (22.9%)	
2 or more	7 (8.5%)	17 (48.5%)	
Pelvic pain VAS ≥ 7	51 (62.2%)	4 (11.4%)	.001

Abbreviations: BMI, body mass index; NS, not significant; VAS, visual analog scale.

^aE group consists of women with surgically confirmed endometriosis and C group women with benign adnexal pathology or request for tubal sterilization without surgical findings of any form of endometriosis. Values are median (25th; 75th percentiles) or n (%).

The subanalysis of the E group patients with DIE lesions (DIE group) and without DIE lesions (non-DIE group) showed higher circulating plasma NET levels in the DIE group compared with the C group ($P = .02$), and no differences were found between the non-DIE group and the C group (median [25th; 75th percentiles]: DIE group: 0.740 [0.489; 1.229]; non-DIE group: 0.646 [0.433; 1.691]; and C group: 0.541 [0.411; 0.653]; Table 2 and Figure 3).

On analyzing the circulating NET levels of patients with ($n = 55$) and without ($n = 62$) severe pelvic pain, regardless of the presence of endometriotic lesions, no significant differences were observed (median [25th; 75th percentiles]: pelvic pain: 0.649 [0.439; 0.991]; no pelvic pain: 0.653 [0.446; 1.181]). Neither were significant differences observed in the analysis of NET levels among patients with ($n = 47$) and without ($n = 70$) infertility history, regardless of the presence of endometriotic lesions (median [25th; 75th percentiles]: infertility: 0.645 [0.389; 1.07]; no infertility: 0.653 [0.451; 1.142]).

Among patients with DIE lesions, no differences in circulating plasma NET levels were observed in cases with infertility ($n = 38$) or without ($n = 27$) (data not shown). The NET levels did not show differences regarding the different locations of DIE: vesical, ureteral, retrouterine, fallopian tubes, retrocervical, uterosacral ligaments, sigmoid, rectovaginal septum, other intestinal location, and vaginal. Moreover, no differences in circulating plasma NET levels were observed in cases of isolated DIE lesions compared to the presence of DIE lesions and OEs (data not shown).

There were no significant differences in circulating NET levels on comparing the follicular versus the luteal phase (median [25th; 75th percentiles]: follicular phase: 0.649 [0.446; 1.051]; luteal phase: 0.565 [0.323; 1.189]). Neither were any differences observed between the follicular and luteal phases in the subanalysis of circulating NET levels among the groups analyzed (data not shown).

Table 2. Circulating Plasma NET Levels in Patients With Surgically Confirmed Endometriosis (E Group, n = 82), in Patients Included in E Group With DIE Lesions (DIE Group, n = 65) and Without DIE Lesions (Non-DIE Group, n = 17), and in Patients With Benign Adnexal Pathology or Request for Tubal Sterilization Without Surgical Findings of Any Form of Endometriosis (C Group, n = 35).^a

	E Group (n = 82)		C Group (n = 35)	P Value
Circulating plasma NET levels	0.734 ^b (0.484; 1.363)		0.541 ^b (0.411; 0.635)	.005 ^b
	DIE Group (n = 65)	Non-DIE Group (n = 17)	C Group (n = 35)	.02 ^c
	0.740 ^c (0.489; 1.229)	0.646 (0.433; 1.691)	0.541 ^c (0.411; 0.635)	

Abbreviations: DIE: deep infiltrating endometriosis; NETs, neutrophil extracellular traps.

^aValues are median (25th; 75th percentiles). Results are expressed as a ratio between mU of patient/mU negative control, being mU = absorbance (10E-3), and arbitrary units (AU) are used. Data from the E and C Groups were compared using the nonparametric Mann-Whitney U test. Data from the 3 groups (DIE, non-DIE, and C groups) were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test and the post hoc Dunn multiple comparison test.

^bP value between E and C groups.

^cP value between DIE and C groups. No significant differences were observed between the DIE and non-DIE groups and between the non-DIE and C groups.

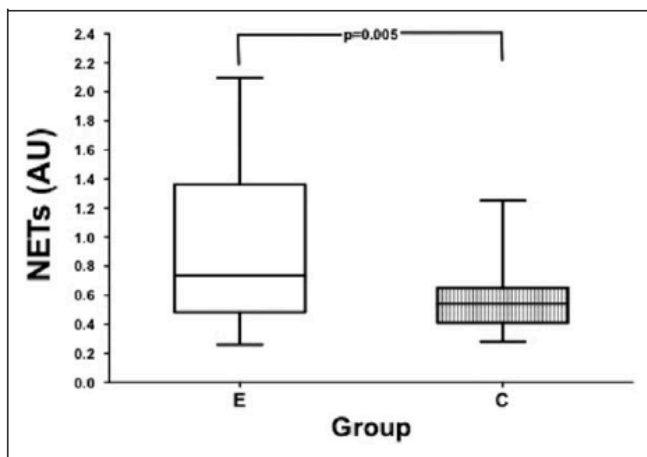


Figure 2. Box plot showing circulating plasma NET levels in patients with surgically confirmed endometriosis (E group, n = 82) and patients with benign adnexal pathology or request for tubal sterilization without surgical findings of any form of endometriosis (C group, n = 35). Each box represents the middle 50% of the data (25th-75th percentiles range). The central horizontal line represents the median. Vertical lines represent the 10th to 90th percentiles range of the data, as indicated by the small horizontal lines. Data from the E and C groups were compared using the nonparametric Mann-Whitney U test. Statistical comparisons between the groups are indicated. AU indicates arbitrary units; NET, neutrophil extracellular traps.

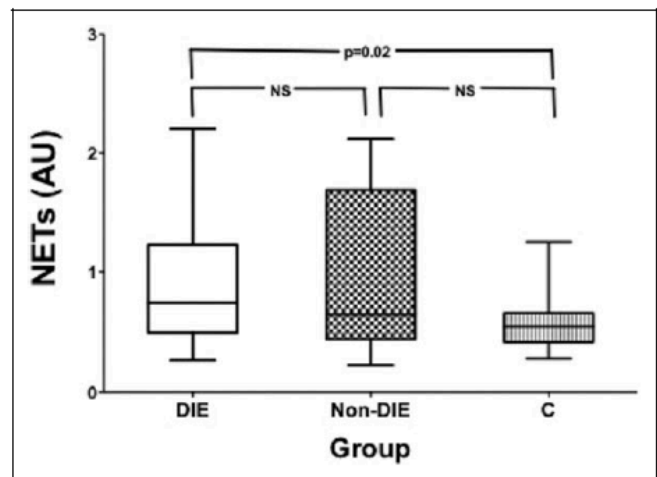


Figure 3. Box plot showing circulating plasma NET levels in patients with DIE (DIE group, n = 65), patients without DIE lesions (non-DIE group, n = 17), and patients with benign adnexal pathology or request for tubal sterilization and without endometriosis (C group, n = 35). Each box represents the middle 50% of the data (25th-75th percentiles range). The central horizontal line represents the median. Vertical lines represent the 10th to 90th percentiles range of the data, as indicated by the small horizontal lines. Data from the 3 groups were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test and the post hoc Dunn multiple comparison tests. Statistical comparisons between groups are indicated. AU: arbitrary units; DIE, deep infiltrating endometriosis; NETs, neutrophil extracellular traps; NS, not significant.

Discussion

This preliminary study evaluating circulating plasma NET levels has shown higher plasma NET levels in patients with endometriosis compared with patients without endometriosis. Neutrophil extracellular traps were first described more than a decade ago by Brinkmann et al⁸ as a structure composed by chromatin fibrils released by neutrophils capable of killing pathogens outside the cells. Neutrophil extracellular traps have an ultrastructure composed by a framework formed by chromatin filaments of about 15 to 17 nm in diameter consisting of modified nucleosomes (DNA and histones), of which histones

account for 70% of the total proteins of the traps. This framework is dotted with globular structures of 50 nm in diameter, which consists of components from neutrophil granules (proteins and enzymes), such as MPO, neutrophil elastase, lactoferrin, and metalloproteinase.^{8,9} Although little is known about the mechanism of NET formation, called NETosis, this process seems to consist of an initial loss of all intracellular membranes followed by the disintegration of the cytoplasmic membrane and the excretion of the cell contents to the exterior of the cell. Neutrophil extracellular traps were first described as a host defense mechanism, in which they were expelled from dying

neutrophils to entrap and kill invading microorganisms.^{9,12} Nonetheless, in the last few years, there is increasing evidence of the involvement of NETs in noninfectious diseases such as systemic lupus erythematosus, psoriasis, gout, rheumatoid arthritis, Crohn disease, and thrombosis,^{7,16} suggesting a role for NETs in the amplification and perpetuation of inflammation. It has been hypothesized that tissue or cellular damage, such as in chronic inflammatory conditions, may induce inflammation with the subsequent synthesis and release of pro-inflammatory cytokines and interleukins, as well as reactive oxygen species, which may recruit neutrophils into the inflammatory focus, where NETosis might take place.⁹ It has been postulated that the accumulation of NETs secondary to excessive NETs formation and/or impaired clearance could contribute to inflammation and organ damage in autoimmune disorders since there is an increased risk of reactivity to a wide range of self-antigens displayed by NETs with the subsequent autoantibody production. Therefore, the accumulation of excessive NETs has been associated with activation of innate immunity, resulting in an excessive activation of adaptive immunity, which underlies in the pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases.^{10,11,17}

Endometriosis is currently considered a chronic inflammatory condition, in which many molecular and cellular alterations have been described, one being the recruitment of immune cells, especially activated macrophages, natural killer cells, and neutrophils, to endometriosis lesions.^{1,5,6} Although the role of neutrophils in the pathogenesis of endometriosis has not been completely defined, it is possible that the local inflammatory milieu in ectopic endometrial sites may induce the migration of neutrophils into the endometriosis foci and the subsequent process of NETosis, contributing to the maintenance of inflammation in patients with endometriosis. In fact, a recent study by Berkes et al⁷ showed significantly increased NET levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis, compared with the control group,⁷ suggesting that NETs may be involved in the pathophysiology of endometriosis. In this study, peritoneal fluid was collected in a case-control study, in which women underwent laparoscopy. Their results showed that the quantification of NETs was significantly higher in patients with endometriosis compared to controls. Our preliminary study analyzing circulating plasma NET levels showed similar results to those of Berkes et al,⁷ as we found higher plasma NET levels in patients with endometriosis compared to controls. Moreover, we specifically evaluated patients with different forms of endometriosis (with or without associated DIE) and higher levels of NETs were found in the DIE group compared with the non-DIE group and patients without endometriosis (C group). This suggests a possible higher grade of inflammation in patients with DIE, which is considered a more aggressive form of endometriosis.^{3,4,18} For this reason, our results may reflect the systemic inflammatory milieu in endometriosis women and not only their possible role in the biology of local endometriosis lesions. Nevertheless, the role of NETs in endometriosis, and especially in DIE lesions, has not yet been

established, making further studies necessary to ascertain whether these findings are causative, consequential, or coincidental of this gynecological condition.

Our study has several strengths. Firstly, all the blood samples were obtained immediately before surgery in order to assess the basal plasma NET levels. Secondly, this is a prospective case-control study, in which all patients underwent surgery and were definitively classified into the study or control group according to the surgical findings and histology and not only according to the presurgical workup.

Nonetheless, the present study also has some limitations. Firstly, the sample size is small and arbitrarily decided according to previous studies analyzing NET levels in other inflammatory conditions and endometriosis itself.^{7,15,16} Secondly, the C group was composed by controls without endometriosis who underwent surgery for benign adnexal pathology or tubal sterilization to verify the absence of endometriosis lesions, and therefore, not all were completely healthy. Moreover, blood samples were obtained in different phases of the menstrual cycle, which could constitute a limitation due to possible differences in inflammatory status along the cycle, and the subanalysis of our data may be biased because of the small sample size.

In conclusion, this was a preliminary study, which shows that patients with endometriosis, and particularly patients with DIE, have increased plasma NET levels compared with patients without endometriosis, suggesting a higher systemic inflammatory status in patients with DIE and a possible role of NETs in the amplification and maintenance of its inflammatory milieu. Nonetheless, further research is warranted to confirm our findings and to assess the exact role of NETs in the pathophysiological mechanisms of endometriosis.

Acknowledgments

The authors contributed to this work as follows: J.M. contributed to the study concept and design, contributed to acquisition of data, and contributed to analysis and interpretation of data, drafted the article, and approved the version to be published. D.T. contributed to the study concept and design, contributed to acquisition of data, and contributed to analysis and interpretation of data, revised the article critically for important intellectual content, and approved the version to be published. L.M. and A.P. contributed to acquisition and analysis of data, revised the article critically for important intellectual content, and approved the version to be published. J.C.R. and F.C. contributed to the study concept and design, contributed to interpretation of data, revised the article critically for important intellectual content, and approved the version to be published. M.A.M.-Z. contributed to the study concept and design, contributed to acquisition of data, and contributed to analysis and interpretation of the data, revised the article critically for important intellectual content, and approved the version to be published.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the grant “Premi Fi de Residència Emili Letang 2015” from the Hospital Clínic of Barcelona and by a grant from FIS-PI11/00977 within the “Plan Nacional de I + D + I” and co-funded by the “ISCIII-Subdirección General de Evaluación” and “Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).” These funding sources provided financial support for the quantification of circulating plasma NETs.

References

1. Reis FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(4):406-418.
2. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98(3):511-519.
3. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(5):261-275.
4. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009;360(3):268-279.
5. Borrelli GM, Carvalho KI, Kallas EG, Mechsner S, Baracat EC, Abrão MS. Chemokines in the pathogenesis of endometriosis and infertility. *J Reprod Immunol*. 2013;98(1-2):1-9.
6. Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C. Natural killer cells: key players in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(4):291-301.
7. Berkes E, Oehmke F, Tinneberg HR, Preissner KT, Saffarzadeh M. Association of neutrophil extracellular traps with endometriosis-related chronic inflammation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;183:193-200.
8. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacterial. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535.
9. Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2015;14(7):633-640.
10. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):513-530.
11. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps (NETs): double edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012;189(6):2689-2695.
12. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps—the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1612-1620.
13. Bourdel N, Alves J, Pickering G, Ramilo I, Roman H, Canis M. Systematic review of endometriosis pain assessment: how to choose a scale? *Hum Reprod Update*. 2015;21(1):136-152.
14. Speroff L. Regulation of the menstrual cycle. In: Fritz MA, Speroff L, eds. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 8th ed, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business; 2011:199-242.
15. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(3):R122.
16. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012;7(10):e48111.
17. Radic M, Marion TN. Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):465-480.
18. Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic mechanisms of deep infiltrating endometriosis. *Reprod Sci*. 2015;22(9):1053-1059.

4.4. ESTUDI 4

TOTAL CIRCULATING MICROPARTICLE LEVELS AFTER LAPAROSCOPIC SURGICAL TREATMENT FOR ENDOMETRIOMA: A PILOT, PROSPECTIVE, RANDOMIZED STUDY COMPARING STRIPPING WITH CO₂ LASER VAPORIZATION

Article publicat a *The Journal of Minimally Invasive Gynecology*

Munrós J, Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Reverter JC, Rius M, Gracia M, Ros C, Carmona F.

J Minim Invasive Gynecol. 2019 Mar-Apr;26(3):450-455.

doi: 10.1016/j.jmig.2018.05.014. Epub 2018 May 24.

Factor d'impacte: 3.061

2n quartil (Obstetrícia i Ginecologia)



Original Article

Total Circulating Microparticle Levels After Laparoscopic Surgical Treatment for Endometrioma: A Pilot, Prospective, Randomized Study Comparing Stripping with CO₂ Laser Vaporization

Jordina Munrós, MD, Maria-Angeles Martínez-Zamora, MD, PhD, Dolors Tàssies, MD, PhD, Juan Carlos Reverter, MD, PhD, Mariona Rius, MD, Meritxell Gracia, MD, Cristina Ros, MD, PhD, and Francisco Carmona, MD, PhD

From the Department of Gynecology, Clinical Institute of Gynecology, Obstetrics, and Neonatology, Hospital Clinic of Barcelona, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain (Drs. Munrós, Martínez-Zamora, Rius, Gracia, Ros, and Carmona), and Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clinic of Barcelona, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain (Drs. Tàssies and Reverter).

ABSTRACT **Study Objective:** To evaluate serial generation of microparticles (MPs) after laparoscopic stripping or CO₂ laser vaporization in the surgical treatment of patients with ovarian endometrioma (OE).

Design: A prospective, randomized, blinded, pilot study (Canadian Task Force classification I).

Setting: Tertiary care university hospital from December 2014 to July 2016.

Patients: Thirty women with unilateral OE undergoing laparoscopic surgery.

Intervention: Patients were randomly selected to undergo either CO₂ laser vaporization (L group) or laparoscopic stripping (S group) of OE.

Measurements and Main Results: Blood samples were collected before surgery and at 2 hours, 24 hours, 1 month, and 3 months after surgery. An MP generation curve after OE surgery was created. MP generation was greater in the S group than in the L group at all time points evaluated. The MP generation curve showed a significantly higher area under the curve after excisional surgery ($p < .05$).

Conclusion: The higher MP levels in the S group suggest an increased inflammation and procoagulant response after this procedure. *Journal of Minimally Invasive Gynecology* (2019) 26, 450–455. © 2018 Published by Elsevier Inc. on behalf of AAGL.

Keywords: Circulating microparticles; Inflammation; Laparoscopy; Laser vaporization; Ovarian endometrioma; Stripping

Ovarian endometrioma (OE) is very common in patients with endometriosis [1]. The most common surgical methods used in the management of OEs include ovarian stripping and ablation, and the best option is controversial [2–5]. Surgery is associated with a high rate of recurrence [6] and damage to the ovarian reserve [7]. Less aggressive

ablative techniques, such as CO₂ laser vaporization, are probably better at preserving ovarian reserve [4,7–10]. Persistent damage to the ovarian reserve after surgery might result not only from the accidental removal of healthy tissue, but also by the subsequent inflammation [11].

Microparticles (MPs) are extracellular vesicles that can be formed by almost every cell type [12–13] and play roles in coagulation, inflammation, angiogenesis, and cellular signaling [12–15]. MPs are significantly increased in a various pathological conditions, including inflammatory disorders, cardiovascular diseases, sepsis, cancer, trauma, and endometriosis [12–14]. MPs are markers of disease activity and actively participate in the natural history of pathologies [12–13]. An interaction between inflammation and coagulation in patients with endometriosis, in which MPs, platelets, and coagulation factors may be involved, has been suggested [16].

This work was supported by a Premi Fi de Residència Emili Letang 2015 grant from the Hospital Clinic of Barcelona and by a research grant from Lumenis.

Registered at ClinicalTrials.gov (NCT03429881).

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Corresponding author: Francisco Carmona, MD, PhD, Department of Gynecology, Clinical Institute of Gynecology, Obstetrics, and Neonatology, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: fcarmona@clinic.ub.es

Submitted February 21, 2018, Accepted for publication May 17, 2018.

Available at www.sciencedirect.com and www.jmig.org

1553-4650/\$ — see front matter © 2018 Published by Elsevier Inc. on behalf of AAGL.

<https://doi.org/10.1016/j.jmig.2018.05.014>

Several recent studies have described the generation of circulating MPs after surgical procedures and characterized their potential contribution to postsurgical complications, such as inflammation and thrombosis [17–19]. Thus, the aim of the present study was to compare the generation of MPs over time as markers of inflammation between 2 different procedures for OE surgery, stripping and CO₂ laser ablation.

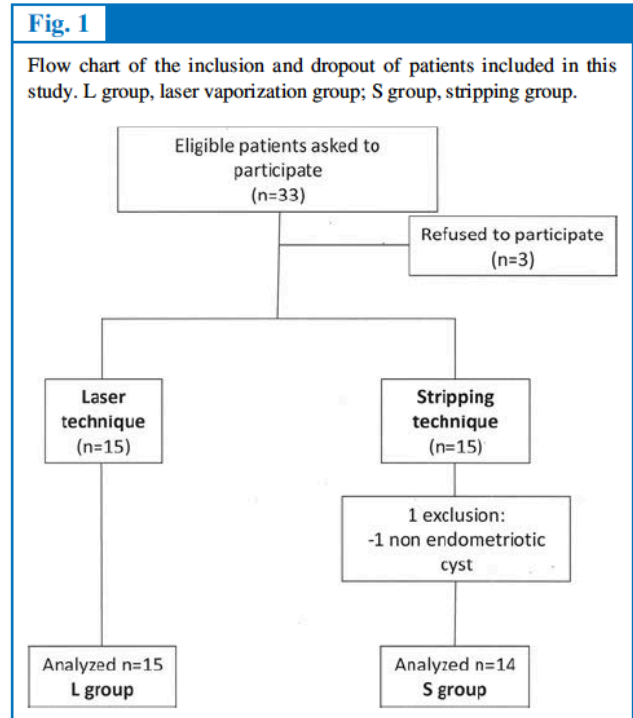
Material and Methods

Study Design and Subjects

We recruited 33 adult women with unilateral OE between January 2015 and July 2016 at the Hospital Clinic of Barcelona. Participation was voluntary, and all participants signed an informed consent document after being informed of the study's aims and procedure. This study was approved by the hospital's Clinical Research Ethics Committee (HBC/2015/0068).

Inclusion criteria were age 18 to 40 years and unilateral symptomatic OE ≥ 3 cm. The exclusion criteria were previous pelvic surgery; history of cancer; suspected malignancy; endocrine, cardiovascular, or systemic disease; pregnancy or breastfeeding within 6 months before sample collection; presurgical suspicion or evidence of deep endometriosis; presurgical suspicion or evidence of premature ovarian failure; menopausal status; endometrial hyperplasia or polyps; uterine leiomyomata; an inflammatory disease or infectious condition within 6 months before sample collection; and the use of anti-inflammatory drugs or estrogen-suppressive drugs, including oral contraceptives, gonadotropin-releasing hormone agonists, progestins, or danazol, in the preceding 3 months. We excluded patients with suspected deep endometriosis according to an extensive preoperative workup (including magnetic resonance imaging when necessary) routinely performed in such patients. The presence and severity of dysmenorrhea, deep dyspareunia, nonmenstrual pelvic pain, and dyschezia were assessed using a 11-point numeric rating scale, with 0 indicating absence of pain and 10 indicating the worst pain possible [20]. Patients were considered for surgery who complained of at least 1 moderate to severe pain symptom (6–8 points, moderate pain; 9 or 10 points, severe pain) or infertility. The presence of adenomyosis was considered when 2 or more previously reported criteria [21] were detected on transvaginal ultrasound.

Three patients refused to participate, and thus the final sample comprised 30 subjects. Patients were selected at random to undergo either drainage and laser coagulation of the OE inner lining (L group) or stripping (S group). Treatment allocation was performed via a computer-generated randomization list using the method of simple randomization to either group. Fifteen patients were enrolled in the L group, and 15 were enrolled in the S group. However, 1 patient with a nonendometriotic cyst was excluded from the



S group, and thus the final number of patients in the S group was 14 (Fig. 1).

Operative laparoscopy was performed through insertion of a 12-mm umbilical trocar and two or three 5-mm ancillary trocars in the lower abdomen. All interventions were performed by the same team of surgeons who had a wide experience in both techniques, having performed endometriosis surgical operations 2 to 3 times per week over the preceding 5 years. The same protocol was used during the diagnostic phase of laparoscopy. Standard laparoscopic instruments and a 0-degree video laparoscope were used in all procedures.

Patients in the L group underwent drainage of cyst contents and irrigation and inspection of its inner wall. A biopsy of the cyst wall was sent for routine histological examination to confirm the diagnosis of endometriosis. The cyst was everted to expose the inner cystic wall completely. Vaporization of the internal wall was performed using a fiber CO₂ laser (AcuPulse DUO; Lumenis, Yokneam, Israel) in a radial manner starting from the center and moving to the periphery, at a power density of 12 W/cm² in continuous mode. After identification of the cleavage plane in L group, the wall of the cyst was stripped from the healthy surrounding normal ovarian tissue and sent for histological examination. No sutures were placed after surgery in any group, and hemostasis was achieved by electrocoagulation in the S group.

Sample Collection

Venous blood samples were collected before surgery and at 2 hours, 24 hours, 1 month, and 3 months after surgery.

Table 1

Clinical characteristics of the study cohort			
Characteristic	L group (n = 15)	S group (n = 14)	p value
Age, yr, median (range)	31 (28–34)	30 (28–33)	NS
Body mass index, kg/m ² , median (range)	21.68 (19.99–24.30)	22.72 (20.7–25.39)	NS
Tobacco use, n (%)	3 (20)	2 (14.2)	NS
Indication for surgery, n (%)			
Dysmenorrhea	6 (40)	4 (28.5)	
Infertility	3 (20)	5 (35.7)	NS
Both	6 (40)	5 (35.7)	
Cyst diameter, cm, median (range)	7.3 (4–10)	6.9 (4–11.2)	NS
Laterality, n (%)			
Right	6 (40)	6 (42.8)	NS
Left	9 (60)	8 (57.2)	
Dysmenorrhea NRS ≥ 7 , n (%)	11 (73.3)	12 (85.7)	NS

NRS = numerical rating scale; NS = not significant.

Blood was collected in tubes containing 3.8% trisodium citrate (1/9 vol/vol; BD Biosciences, San Diego, CA). Platelet-free plasma was immediately obtained by double centrifugation, first at 2000 \times g for 10 minutes at 22 °C and then at 5000 \times g for 10 minutes at 4 °C. Plasma was aliquoted, snap-frozen in a mixture of dry ice/ethanol (1/2, vol/vol) and stored at -80 °C.

MP Measurements

To analyze surrogate markers for inflammation after removal of OE, we determined circulating MP levels at baseline, 2 hours, 24 hours, 1 month, and 3 months after surgery, and calculated the area under the curve in both groups. All assays were performed by a single experienced operator. Samples were tested in duplicate. The mean absorbance values for each set of duplicate samples were calculated. When discordant results were obtained (sample values $>20\%$ of the mean), the samples were retested. There were no missing data or outliers. The operator was blind to the group allocation.

Total plasmatic MP levels were determined using a readily available commercial functional assay (Zymuphen MP-Activity Kit; Hyphen BioMed, Neuville, France), as described previously [22–24]. This is a prothrombinase assay based on the property of annexin-V, immobilized onto plastic wells, to bind phosphatidylserine (PS). Calibrators with known amounts of PS are used to obtain a standard curve, and the results are expressed as nanomolar PS equivalents. The calibration is validated when the quality controls provided by the kit are measured within their acceptance range, indicated for each lot on the flyer provided in the kit. The detection threshold of the assay is 0.05 nM. For circulating MPs, the intra-assay coefficient of variation was 5% and the interassay coefficient of variation was 8%. In this study, we used assay batch no. 130207C.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using SPSS 20.0 software (IBM, Armonk, NY). Values from quantitative parameters were expressed as mean and standard deviation (SD) or as median and range. Normality distribution was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. The Student *t* test for both related and unrelated variables was used for comparison of normally distributed continuous variables, and the Mann-Whitney *U* test was used for comparison of non-normally distributed continuous variables. The χ^2 test was used for comparison of categorical variables. A *p* value $<.05$ was considered statistically significant.

Results

Clinical Characteristics

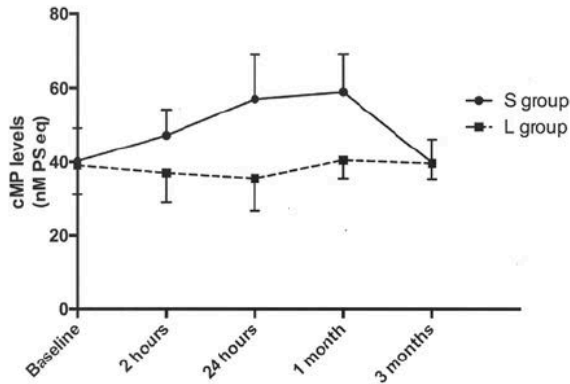
The baseline characteristics of the 2 study groups are presented in Table 1. Demographic characteristics, including median age, body mass index, and tobacco use, were balanced and non-statistically different between the 2 groups. In addition, indications for surgery and the laterality and diameter of OEs were similar in the 2 groups. The rate of adenomyosis was 20% ($n=3$) in the L group and 14% ($n=2$) in the S group. In the L group, 53% of the patients ($n=8$) were sampled in the follicular phase and 47% were sampled in the luteal phase, compared with 60% ($n=9$) and 40% ($n=6$), respectively, in the S group. Thus, the percentages of patients sampled in one or another phase of the cycle were balanced between the groups.

Total Circulating MP Level

Data of MP levels over time for both groups are presented in Fig. 2. Total mean MP levels at baseline were similar between groups. After surgery, MP levels were higher in the S group at all time points analyzed compared

Fig. 2

Analysis of microparticle levels over time. The horizontal axis indicates time after surgery, (i.e., baseline, 2 hours, 24 hours, 1 month, and 3 months after surgery). Values are reported as mean \pm SD. Stripping is shown by the solid line for the S group; laser vaporization, by the dashed line for the L group.



with the L group and increased over time until the 1-month measurement, with a significantly greater calculated area under the curve in the S group than in the L group ($p < .05$). This indicates that MP generation after excision of OE is higher than after laser vaporization. In the last time point, 3 months after surgery, mean MP levels in S group returned to basal levels, and were similar in both groups. Tumor size, laterality, and phase of menstrual cycle did not influence the results (data not shown). MP levels were not different between patients with adenomyosis and those without adenomyosis (data not shown).

Discussion

This pilot study shows that MPs are generated after excision of OE, but not after laser ablation. The increase in circulating MP levels is temporary, and levels revert to basal conditions by 3 months after the excision procedure. These results suggest that compared with laser vaporization, the stripping technique triggers a more pronounced short-term inflammation response.

Increased MP levels can be detected in multiple proinflammatory and procoagulant conditions, such as atherosclerosis, venous thromboembolism, and systemic lupus erythematosus [12,13]. Moreover, MP levels are increased in patients with recurrent miscarriages [22], patients who experience recurrent implantation failure [23], and patients with deep infiltrating endometriosis (DIE) [24]. However, MP levels are not altered in patients with OE without DIE [24].

Hormonal, inflammatory, and immune responses and angiogenesis are altered in patients with endometriosis, and combine to promote the survival and growth of endometriotic lesions [25]. Moreover, crosstalk between coagulation and inflammation also has been reported in endometriosis.

Ding et al [26] reported that platelets are recruited to endometriotic lesions, where they release angiogenic factors and promote expression of antiapoptotic and proinflammatory genes in the endometrial cells. The increase in MPs reported after surgery could affect inflammatory and immune responses and contribute to the inflammatory and procoagulant status reported in OE patients.

Previous reports have shown that cardiac and vascular surgeries cause increases in platelet-derived MPs (PMPs) and endothelial-derived MPs (EMPs) [13–17], and that extended hepatic surgery results in increases in PMPs, EMPs, and leukocyte-derived MPs [18]. Here we report that total MP levels increase after removal of OE using a laparoscopic excisional procedure. To our knowledge, this is the first study in which the generation of MPs has been measured after surgery in patients with endometriosis.

The rate of recurrence of OE after surgery is high [3], and a significant number of patients undergo multiple surgeries. Considering that repetitive surgery significantly reduces fertility [25], it is important to explore procedures that minimize surgical damage to healthy ovarian tissue. Laser vaporization is a tissue-sparing technique that may provide better preservation of ovarian reserve than excision; however, studies comparing stripping and laser vaporization remain scarce [4,7–8]. Laser vaporization has been proposed as superior to cystectomy in preserving ovarian function at 6 months after surgery [4]. In that study, the authors showed that mean anti-Müllerian hormone levels were significantly decreased by 6 months after cystectomy (from 3.9 ± 0.4 at baseline to 2.9 ± 0.2 at 6 months; $p = .026$), but remained similar over this time span after laser vaporization (from 4.5 ± 0.4 at baseline to 3.99 ± 0.6 at 6 months, $p =$ not significant [MS]). Conversely, mean antral follicle count increased by 6 months after laser vaporization (from 1.3 ± 0.5 at baseline to 4.36 ± 0.8 at 6 months; $p = .02$), but not after stripping (from 2.0 ± 1 at baseline to 2.4 ± 0.8 at 6 months; $p =$ NS). This increase in antral follicle count after laser vaporization has been detected as early as 1 and 3 months after surgery [3]. In agreement with the study of Tsolakidis et al. [4], Ottolina et al. [3] found no differences in anti-Müllerian hormone levels at 3 months after laser vaporization. However, we previously showed that laser vaporization yields similar pregnancy rates than cystectomy at long-term follow-up (1 and 5 years) [8]. Moreover, a subsequent meta-analysis confirmed comparable pregnancy rates were between cystectomy and laser vaporization (relative risk, 0.92; 95% confidence interval, 0.30–2.80; $p = 0.89$) [7]. Moreover, surgical damage to the ovarian reserve is not only related to the procedure itself [4–10]; it has been suggested that the persistent reduction of ovarian reserve observed after stripping could be caused by postsurgical inflammation and vascular compromise [11]. The increase in MP observed after stripping may reflect an increased inflammatory response, which may negatively impact ovarian reserve. Conversely, the unaltered MP levels after laser vaporization may reflect

a minimal inflammation response, which would not be detrimental for the healthy ovarian tissue. However, it should be noted that this is a pilot study, and the relevance of the transient increase in MP levels after the stripping technique is not clear. Permanent consequences for the ovarian tissue of this transient inflammation remain to be established.

We measured the functional procoagulant potential of PS-positive MPs (annexin V binding) and found greater procoagulant activity of MPs detected after OE excision. In this vein, several studies reported that MPs generated after cardiac, vascular, or hepatic resection surgeries were associated with a hypercoagulable state [13,17–18].

The main strength of this study is the inclusion and exclusion criteria, which allowed us to limit additional factors that affect MP levels. Increased MP levels can be detected in multiple proinflammatory and procoagulant conditions, including DIE [11,12,15]. Importantly, MP levels are not altered in patients with OE without DIE [15]. Therefore, we excluded patients with DIE and other comorbidities involved in MP generation, such as endocrine, cardiovascular, systemic, inflammatory diseases, and infectious conditions.

This study has some limitations. First, as a preliminary pilot study, it had a small sample size and thus limited statistical power. Because this is a preliminary study, the sample size was decided arbitrarily, albeit in keeping with previous studies analyzing MP in other inflammatory diseases [27,28] and biomarkers in endometriosis [29]. Sample size planning for a clinical study is generally based on estimates from previous information and performed to ensure the ability to detect differences in outcomes [30,31]. The present study lacked previous information on the subject at study planning. Thus, the number of patients recruited was small from a biometric standpoint, and the study was intended to be exploratory in nature.

Second, we cannot formally exclude some confounding factors in MP generation, such as the effect of menstrual cycle or the differences between procedures in the method used to achieve hemostasis. However, the percentage of patients in the follicular or luteal phase in each treatment group was balanced. Moreover, we previously reported that microparticle-tissue factor levels were similar in the follicular and luteal phases [15].

Third, we have not identified the different MP subtypes or other inflammation and coagulation parameters. Further characterization of the MP population caused by excisional surgery of OE (i.e., characterization of EMPs, PMPs, and leucocyte-derived MPs) would provide insight into the role and significance of this response. Moreover, analysis of independent markers for inflammation and coagulation after ablation or stripping, such as levels of proinflammatory interleukins and cytokines, galectin-3-binding protein, and alpha-2 microglobulin and additional coagulation tests, would expand and strengthen our data.

Fourth, we cannot exclude a possible effect of electrocoagulation in MP production. Nevertheless, in stripping

surgery, the use of a method to achieve hemostasis is mandatory, because the consequences for MP generation would be inseparable.

Finally, the analysis of local MP levels is always more accurate than systemic levels; however, we chose to analyze systemic levels for practical reasons. Along with the basal time point, MP levels were analyzed at 2 hours, 24 hours, 1 month, and 3 months after surgery and obtaining peritoneal fluid samples was not feasible at these time points. Obtaining peritoneal fluid at later time points would involve further surgeries and patient discomfort, apart from ethical concerns.

Nevertheless, we believe that future directions in research should include larger long-term follow-up studies that simultaneously assess MPs and other inflammatory and coagulation parameters, as well as markers for ovarian reserve, fertility, and recurrence rate comparing both surgical techniques.

In conclusion, our data show that MP levels were higher after stripping than after CO₂ laser vaporization, suggesting an increased inflammation and procoagulant response after this procedure.

References

1. Kaponis A, Taniguchi F, Azuma Y, et al. Current treatment of endometrioma. *Obstet Gynecol Surv.* 2015;70:183–195.
2. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2014;29:400–412.
3. Ottolina J, Castellano LM, Ferraris S, et al. The impact on ovarian reserve of CO₂ laser fiber vaporization in the treatment of ovarian endometrioma: a prospective clinical trial. *J Endometr Pelvic Pain Disord.* 2017;9:206–210.
4. Tsolakidis D, Pados G, Vavilis D, et al. The impact on ovarian reserve after laparoscopic ovarian cystectomy versus three-stage management in patients with endometriomas: a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2010;94:71–77.
5. Shah DK, Mejia RB, Lebovic DI. Effect of surgery for endometrioma on ovarian function. *J Minim Invasive Gynecol.* 2014;21:203–209.
6. Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update.* 2009;15:441–461.
7. Dan H, Limin F. Laparoscopic ovarian cystectomy versus fenestration/coagulation or laser vaporization for the treatment of endometriomas: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Gynecol Obstet Invest.* 2013;76:75–82.
8. Carmona F, Martínez-Zamora MA, Rabanal A, Martínez-Román S, Balasch J. Ovarian cystectomy versus laser vaporization in the treatment of ovarian endometriomas: a randomized clinical trial with a five-year follow-up. *Fertil Steril.* 2011;96:251–254.
9. Mircea O, Puscasiu L, Resch B, et al. Fertility outcomes after ablation using plasma energy versus cystectomy in infertile women with ovarian endometrioma: a multicentric comparative study. *J Minim Invasive Gynecol.* 2016;23:1138–1145.
10. Roman H, Auber M, Bourdel N, Martin C, Marpeau L, Puscasiu L. Postoperative recurrence and fertility after endometrioma ablation using plasma energy: retrospective assessment of a 3-year experience. *J Minim Invasive Gynecol.* 2013;20:573–582.
11. Sugita A, Iwase A, Goto M, et al. One-year follow-up of serum anti-müllerian hormone levels in patients with cystectomy: are different sequential changes due to different mechanisms causing damage to the ovarian reserve? *Fertil Steril.* 2013;100:516–522. e3.

12. Suades R, Padró T, Badimon L. The role of blood-borne microparticles in inflammation and hemostasis. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41:590–606.
13. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol.* 2011;33:469–486.
14. Park MS, Owen BA, Ballinger BA, et al. Quantification of hypercoagulable state after blunt trauma: microparticle and thrombin generation are increased relative to injury severity, while standard markers are not. *Surgery.* 2012;151:831–836.
15. Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10:356–364.
16. Wu Q, Ding D, Liu X, Guo SW. Evidence for a hypercoagulable state in women with ovarian endometriomas. *Reprod Sci.* 2015;22:1107–1114.
17. Tempo JA, Englyst NA, Holloway JA, Smith DC. Platelet microvesicles (microparticles) in cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2016;30:222–228.
18. Banz Y, Item GM, Vogt A, Rieben R, Candinas D, Beldi G. Endothelial- and platelet-derived microparticles are generated during liver resection in humans. *J Invest Surg.* 2016;29:20–31.
19. Ikeda M, Iwamoto SI, Imamura H, Furukawa H, Kawasaki T. Increased platelet aggregation and production of platelet-derived microparticles after surgery for upper gastrointestinal malignancy. *J Surg Res.* 2003;115:174–183.
20. Bourdel N, Alves J, Pickering G, Ramilo I, Roman H, Canis M. Systematic review of endometriosis pain assessment: how to choose a scale. *Hum Reprod Update.* 2015;21:136–152.
21. Van den Bosch T, Dueholm M, Leone FP, et al. Terms, definitions and measurements to describe sonographic features of myometrium and uterine masses: a consensus opinion from the Morphological Uterus Sonographic Assessment (MUSA) group. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46:284–298.
22. Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Reverter JC, et al. Increased circulating cell-derived microparticle count is associated with recurrent implantation failure after IVF and embryo transfer. *Reprod Biomed Online.* 2016;33:168–173.
23. Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Creus M, et al. Higher levels of procoagulant microparticles in women with recurrent miscarriage are not associated with antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod.* 2016;31:46–52.
24. Munrós J, Martínez-Zamora MA, Tàssies D, et al. Total circulating microparticle levels are increased in patients with deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod.* 2017;32:325–331.
25. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10:261–275.
26. Ding D, Liu X, Duan J, Guo SW. Platelets are an undicted culprit in the development of endometriosis: clinical and experimental evidence. *Hum Reprod.* 2015;30:812–832.
27. Guiducci S, Distler JH, Jüngel A, et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2845–2853.
28. Leonetti D, Reimund JM, Tesse A, et al. Circulating microparticles from Crohn's disease patients cause endothelial and vascular dysfunctions. *PLoS One.* 2013;8:e73088.
29. Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, et al. Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril.* 2013;99:1135–1145.
30. Daya S. Methodological issues in infertility research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006;20:779–797.
31. Röhrig B, du Prel JB, Wachtlin D, Kwiecien R, Blettner M. Sample size calculation in clinical trials. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107:552–556.

5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

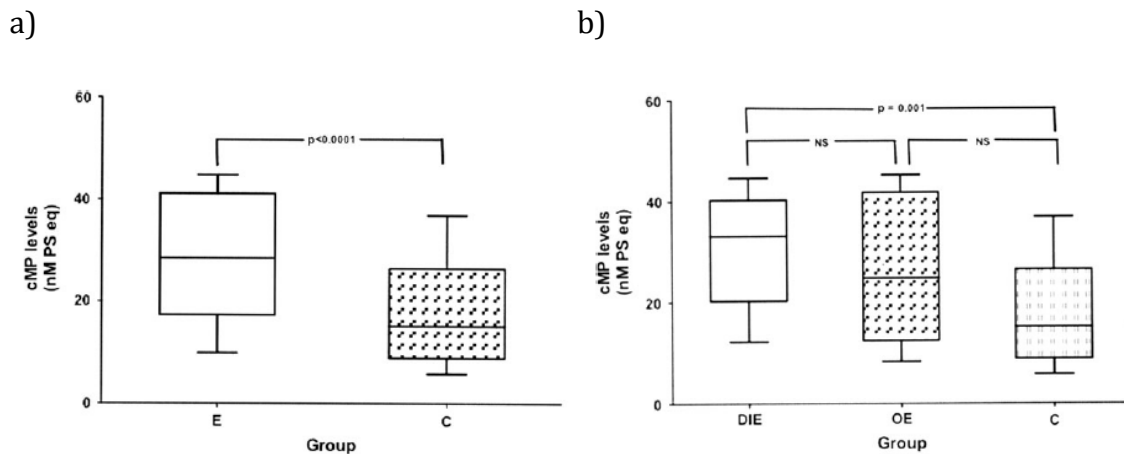
La fisiopatologia de l'E continua essent, malgrat els avenços d'aquests últims anys, un aspecte prou desconegut i de cabdal importància per a la milloria del maneig clínic d'aquestes pacients. És fonamental, per tant, el progrés en el coneixement dels mecanismes implicats en l'aparició, el manteniment i la progressió d'aquesta malaltia per tal de permetre el desenvolupament de noves eines diagnòstiques i millorar-ne els tractaments, tant mèdics com quirúrgics. Els treballs realitzats en la present tesi doctoral sobre aquesta temàtica han mostrat, en resum, els resultats següents que es discuteixen a continuació.

En els darrers anys, s'ha definit l'E com una patologia inflamatòria sistèmica crònica (Giudice and Kao, 2004; Agic et al., 2006; Reis et al., 2013; Kvaskoff et al., 2015), en la que el fenotip d'EP presentaria un major estat inflamatori i una major disfunció immunitària i alteració hormonal, juntament amb una major activació de processos proliferatius, angiogènics i neurogènics en comparació amb l'EO i l'ESP, pel que es postula que podria tractar-se d'una entitat específica amb mecanismes fisiopatològics diferenciats de la resta dels subtipus (Tosti et al., 2015). A més, i de forma similar a altres patologies inflamatòries que presenten alhora un estat protrombòtic, recentment també s'ha descrit el possible estat d'hipercoagulabilitat de les pacients amb E (Ding et al., 2015; Guo et al., 2015; Wu Q. et al., 2015; Viganò et al., 2018).

Les cMP es consideren actualment no només marcadors de dany cel·lular sinó també moduladors de mecanismes relacionats amb l'hemostàsia, la immunitat, la inflamació i l'angiogènesi i, de fet, s'han observat nivells elevats de cMP en certes patologies inflamatòries i protrombòtiques (Barteneva et al. 2013; Buzas et al., 2014). Per altra banda, s'ha observat la presència del TF en el teixit endometrial de pacients amb E i la seva relació amb l'angiogènesi (Kikrun et al., 2008; Kikrun et al., 2009; Kikrun, 2012). Un subgrup de cMP, anomenat cMP-TF per l'expressió de TF a la seva superfície, ha demostrat ser present, a nivell plasmàtic, en nivells superiors als d'individus sans en certes condicions patològiques relacionades amb processos neoplàsics, infecciosos i protrombòtics (Van Es et al., 2015). Prenent en consideració tots aquests supòsits i amb l'objectiu d'avaluar els nivells d'aquests factors en el plasma de les pacients amb E diagnosticada i confirmada quirúrgicament, es van dissenyar el primer (**ESTUDI 1**) i el segon (**ESTUDI 2**) estudis que componen aquesta tesi doctoral.

L'ESTUDI 1 és un estudi preliminar dissenyat per avaluar els nivells plasmàtics de cMP, cMP-TF i sTF en dones amb E. Tenint en compte els resultats obtinguts, podem afirmar que és el primer treball de recerca que demostra nivells plasmàtics més elevats de cMP, però no de cMP-TF ni sTF, en pacients amb E. Aquesta troballa sembla ser atribuïble al subgrup de pacients amb EP però no a pacients amb EO sense EP (Figura 2). Desconeixem si els resultats obtinguts en són causa o conseqüència, però hi hauria motius plausibles per afirmar que les cMP podrien estar relacionades amb la fisiopatologia de l'E i, en concret, de l'EP.

Figura 2. Diagrama de caixes amb els nivells plasmàtics de cMP (nM PS eq) en pacients amb E (*E group*) i sense (*C group*) (Figura 2a), i els nivells plasmàtics de cMP en pacients amb EP (*DIE group*), EO sense EP (*OE group*) i sense E (*C group*) (Figura 2b). Es mostra el valor de significació estadística en cada cas.



cMP: micropartícules circulants; nM PS eq: equivalents nanomolars de fosfatidilserina; E: endometriosi; C: control; DIE: *deep infiltrating endometriosis* que és el terme en anglès per “endometriosi profunda”; OE: *ovarian endometrioma*, que és el terme en anglès per “endometriosi ovàrica” o “endometrioma”; NS: no significatiu.

Com ja s’ha esmentat prèviament en la present tesi doctoral, l’E és considerada actualment una condició ginecològica inflamatòria sistèmica (Agic et al., 2006; Kvaskoff et al., 2015), en la fisiopatologia de la qual s’han implicat diversos mecanismes proinflamatoris, angiogènics i immunitaris (Reis et al., 2013). Dels

diversos fenotips d'E descrits, s'ha detectat una major activació de processos inflamatoris i immunitaris i una major alteració de mecanismes hormonals, així com una major proliferació cel·lular, angiogènesi i neurogènesi, en l'EP en comparació amb els altres subtipus. Per aquest motiu, s'especula que l'EP podria ser un fenotip diferenciat d'E respecte als altres amb una fisiopatologia específica (Tosti et al., 2015; Donnez, 2017; Gordts et al., 2017).

Des de fa anys hi ha evidència científica de la relació entre els fenòmens inflamatoris i hemostàtics, els mecanismes moleculars i cel·lulars dels quals semblen estar intrínsecament vinculats. En aquesta íntima relació entre inflamació i coagulació s'ha descrit la implicació, entre d'altres factors, de les plaquetes, el sistema de contacte, les cMP i el TF. L'estat d'hipercoagulabilitat de malalties inflamatòries, així com l'estat proinflamatori de certes condicions protrombòtiques ha estat descrit en múltiples patologies com la sèpsia, les patologies malignes, la malaltia cardiovascular, la diabetis, el lupus eritematós sistèmic, la síndrome antifosfolípídica, la malaltia de Crohn i certes condicions obstètriques com la preeclàmpsia (Mackman, 2009; Barteneva et al., 2013; Buzas et al., 2014; Franco et al., 2015). L'E, com a patologia inflamatòria que es considera, sembla també presentar un estat d'hipercoagulabilitat segons l'evidència científica recent. Hi ha diversos grups de recerca que descriuen troballes que justificarien aquest fet, com s'esmenten a continuació. Per una banda, s'ha detectat un escurçament del temps de tromboplastina parcial activada en les pacients amb E (Wu Q. et al., 2015; Viganò et al., 2018) i també del temps de trombina i un increment en els nivells de fibrinogen i del percentatge de plaquetes circulants activades en comparació amb pacients controls (Wu Q. et al., 2015; Ding et al., 2018). D'altra banda, sembla ser que les plaquetes podrien representar un paper important en el desenvolupament de l'E, ja que s'han detectat agregats plaquetaris en els implants endometriòsics de forma concomitant a un increment de la proliferació cel·lular i de factors proinflamatoris i neoangiogènics en aquestes localitzacions, pel que s'ha especulat que les plaquetes podrien desenvolupar un rol fonamental en els fenòmens inflamatoris, immunitaris i angiogènics locals que apareixen a l'E (Ding et al., 2015; Du et al., 2017). Finalment, s'ha postulat que els cicles repetitius de lesió tissular i reparació que tindrien lloc secundàriament al sagnat cíclic ectòpic que s'estableix en les pacients amb E podrien conduir a l'agregació i activació de plaquetes a aquestes localitzacions i, en conseqüència, induir la generació de cMP (Guo et al., 2015).

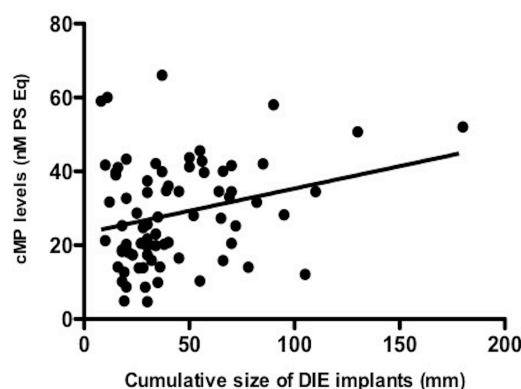
Els **dos primers estudis** que componen aquesta tesi doctoral s'han focalitzat en l'avaluació dels nivells plasmàtics de cMP en les pacients amb E i els resultats obtinguts semblen estar en relació amb tots aquests supòsits descrits.

Les cMP, fins ara considerades únicament com a marcadors de dany tissular o cel·lular, han estat implicades en múltiples processos relacionats amb la inflamació, l'hemostàsia, la immunitat, l'angiogènesi, la remodelació i la proliferació cel·lulars (Buzas et al., 2014) i s'han detectat nivells elevats en diverses condicions inflamatòries i protrombòtiques (Lynch and Ludlam, 2007; Barteneva et al., 2013). A l'**ESTUDI 1** es van detectar nivells plasmàtics més elevats de cMP en les pacients amb E, que semblarien ser atribuïbles a les pacients afectes d'EP. Aquests resultats podrien ser el reflex de l'estat proinflamatori i possiblement d'hipercoagulabilitat ja descrit en aquestes pacients. Els nivells superiors de cMP detectats en pacients amb EP podrien estar en relació, en aquest fenotip diferenciat de la malaltia, amb la major activació de diversos mecanismes moleculars i cel·lulars, tal i com han suggerit alguns autors (Tosti et al., 2015; Gordts et al., 2017). Tot i que en el nostre **ESTUDI 1** no s'ha avaluat la relació entre els nivells més elevats de cMP i els diversos mecanismes implicats en el desenvolupament i manteniment de l'E, tenint en compte tots els supòsits descrits al llarg d'aquesta tesi doctoral, es pot concloure que hi hauria motius suficients per suposar una possible implicació d'aquests factors en la fisiopatologia de l'E i, més concretament, de l'EP. En aquest sentit, les cMP podrien estar implicades en el manteniment i progressió dels implants d'EP en localitzacions extrauterines per la seva acció proinflamatòria, ja que s'ha descrit que les cMP participaren en l'activació i alliberament de citokines, ILs i COX-2; per la seva acció protrombòtica, ja que han estat descrites en la cascada de la coagulació per la seva capacitat d'unió a factors de la coagulació, per la interacció amb factors com la P-selectina a través del PSGL-1, així com també per l'expressió de TF a la seva superfície; i, finalment, per la seva acció neoangiogènica, degut a l'expressió de proteases i TF a la seva superfície.

A l'**ESTUDI 2**, i de forma similar a l'**1**, es van constatar també nivells plasmàtics superiors de cMP en les pacients amb EP en comparació amb les pacients amb EO sense EP i les pacients sense E. Aquestes troballes corroboren els resultats obtinguts en el nostre **primer estudi** pilot sobre les nivells de cMP en les pacients amb E i donarien suport a la hipòtesi que les cMP semblen estar implicades en la fisiopatologia de l'EP pel seu rol en fenòmens inflamatoris i procoagulants. En aquest

segon estudi es va valorar la possible relació entre els nivells obtinguts de cMP i la gravetat de la malaltia. Per aquest motiu es van analitzar els següents paràmetres, que es va considerar que podrien ser indicadors de la gravetat de l'EP: dismenorrea, dispareunia, àlgies pelvianes cròniques, disquèzia i/o disúria severes; antecedents d'hematúria i/o rectorràgies; antecedent personal d'esterilitat; presència concomitant d'adenomiosi, EO i/o adherències de localització pelviana; la classificació en estadis III/IV de la rASRM; els compartiments afectats per EP segons la classificació *Enzian*; el número de localitzacions afectades per lesions d'EP (d'1 a 3 localitzacions o més de 3) i la quantitat de teixit endometriòsic present a cada pacient quantificat com el sumatori de la mida de tots els implants d'EP extirpats durant el procediment quirúrgic. Cap dels paràmetres analitzats en les pacients amb EP va presentar nivells superiors de cMP excepte el sumatori de la mida dels implants d'EP, on es va detectar una correlació positiva amb els nivells plasmàtics de cMP (anàlisi de correlació de Pearson: coeficient de correlació r 0.264; p 0.022) (Figura 3).

Figura 3. Correlació entre el sumatori de la mida dels implants d'EP i els nivells plasmàtics de cMP (nM PS eq).



cMP: micropartícules circulants; nM PS eq: equivalents nanomolars de fosfatidilserina; DIE: *deep infiltrating endometriosis* que és el terme en anglès per “endometriosi profunda”.

Les troballes de l'**ESTUDI 2** posen de manifest, per tant, que en el subgrup de pacients amb EP, aquelles amb una major càrrega de teixit endometriòsic, presenten nivells superiors de cMP amb una correlació positiva amb significació estadística. Aquestes dades obtingudes podrien reflectir un major estat inflamatori en aquest subgrup de pacients amb una forma més severa de la patologia i podrien suggerir una possible participació de les cMP en la seva fisiopatologia. De fet, s'ha de destacar que estudis previs a la literatura on s'han avaluat els nivells de cMP en cas de neoplàsies, han descrit una correlació positiva entre aquests nivells i la càrrega de teixit tumoral (Toth et al., 2008; Wang et al., 2013) i els autors conclouen que les dades obtingudes podrien estar en relació amb l'activació tissular i la progressió neoplàsica així com també podrien reflectir un major estat procoagulant. Per tant, i de forma similar, es podria considerar que els resultats obtinguts a l'**ESTUDI 2** semblarien estar en relació amb un major estat inflamatori i procoagulant en el cas de les pacients amb EP amb una major càrrega de teixit endometriòsic, i que seria la quantitat tissular d'EP, i no les altres variables analitzades, la que indicaria una major gravetat i agressivitat de la malaltia.

Tenint en compte tot l'esmentat prèviament, les dades obtingudes als **dos primers estudis** suggereixen que les cMP podrien ser un nou mecanisme implicat en la fisiopatologia de l'E i, en concret de l'EP, ja que és en aquest subgrup de pacients on s'han detectat els nivells plasmàtics més elevats de cMP i, especialment, en les pacients amb EP que presentaven una major quantitat de teixit endometriòsic. Aquest fet podria estar relacionat, per tant, amb el desenvolupament i establiment d'un major estat inflamatori i, conseqüentment, amb la major agressivitat i gravetat d'aquest fenotip de la malaltia, tal i com sembla desprendre's de l'**ESTUDI 2**. Cal considerar, però, que els nostres **ESTUDIS 1 i 2** són, essencialment, estudis preliminars i al nostre coneixement, semblen ser els primers sobre aquesta temàtica. És per aquest motiu que calen més estudis en aquesta línia de recerca per confirmar els nostres resultats i explorar els mecanismes concrets pels quals les cMP participarien de la fisiopatologia de l'EP.

Pel que fa al TF, es va considerar en el disseny de l'**ESTUDI 1** la seva possible relació amb l'E pel fet que estudis previs havien demostrat un augment de la seva expressió a les cèl·lules glandulars de l'endometri eutòpic i ectòpic de les pacients amb E i també a les cèl·lules endotelials i macròfags dels implants endometriòsics (Kikrun et al., 2008; Kikrun, 2012; Lin et al., 2012; Ding et al., 2015). El TF, fins ara

implicat essencialment en funcions hemostàtiques, ha estat descrit com un factor clau en l'angiogènesi mitjançant la via de senyalització del PAR i per l'alliberament de múltiples substàncies proangiogèniques en el context de l'activació de la cascada de coagulació (Kikrun et al., 2009; Osuga et al., 2012) i, en aquest sentit, sembla desenvolupar un paper important en la fisiopatologia de condicions malignes i inflamatòries (Mackman, 2009). En la circulació, el TF es pot trobar com a TF soluble (sTF) o unit a cMP (cMP-TF). S'ha descrit el rol de les cMP-TF en la inflamació, la progressió tumoral i l'angiogènesi, així com també la seva implicació en el procés d'activació de la coagulació (Lin et al., 2012) i s'han observat nivells plasmàtics més elevats de cMP-TF en pacients amb condicions patològiques com neoplàsies, estats infecciosos o d'hipercoagulabilitat (Van Es et al., 2015). Tenint en compte tots aquests supòsits, també es van avaluar a l'**ESTUDI 1** els nivells de plasmàtics de TF tant en forma de cMP-TF com de sTF. L'avaluació d'aquests dos factors es va motivar pel fet que el sTF podia no reflectir necessàriament la quantitat i/o funció del TF localitzat a nivell dels implants endometrials així que el fet d'estudiar també la presència de cMP-TF podria aportar més informació sobre la implicació del TF en l'E tenint en compte la seva possible generació secundària a l'activació cel·lular que tindria lloc a les localitzacions abans esmentades on s'ha detectat un augment de l'expressió de TF. Tot i això, a l'**ESTUDI 1** no es van detectar diferències ni en els nivells de sTF ni de cMP-TF entre les pacients sense E i les pacients amb E ni tampoc tenint en compte, en el grup de pacients amb E, la presència o no d'EP. Això podria ser degut al fet que les cMP-TF, a diferència de les cMP, no participin de la fisiopatologia de l'E o bé hi hauria la possibilitat que la mesura de l'activitat funcional de les cMP-TF fos tècnicament difícil en mostres plasmàtiques amb nivells baixos de cMP-TF (Key and Mackman, 2010; Hellum et al., 2012). Tot i això, aquesta segona opció seria menys probable ja que tampoc es van detectar diferències en els nivells de sTF en els diferents grups de pacients de l'**ESTUDI 1**, pel que semblaria que el rol del TF en l'E podria ser més a nivell local que no sistèmic, ja que, segons els resultats del nostre estudi, l'augment d'expressió del TF descrit a les cèl·lules glandulars de l'endometri eutòpic i ectòpic i als implants endometriòsics de pacients amb E (Kikrun et al., 2008; Kikrun, 2012; Lin et al., 2012, Ding et al., 2015), no es reflecteix amb un augment en els nivells plasmàtics del TF, avaluat en forma de sTF i de cMP-TF.

Cal tenir en compte en la valoració dels resultats, les limitacions pròpies d'aquests **ESTUDIS 1 i 2**. Com a estudis preliminars que són, la mostra de pacients podria ser considerada relativament reduïda i fou decidida arbitràriament tenint en compte altres estudis en els que també s'avaluaren nivells de cMP en malalties inflamatòries (Giuducci et al., 2008; Leonetti et al., 2013) i biomarcadors en l'E (Fassbender et al., 2013). Una altra limitació seria el fet que el grup control no estava format per pacients completament sanes sinó que algunes d'elles presentaven patologia annexial benigna i era aquesta la indicació de la intervenció quirúrgica; tot i així, l'elecció d'aquest grup de pacients com a control és similar a estudis previs realitzats per altres grups de treball internacionals sobre l'E (Santulli et al., 2015). També cal esmentar com a limitació de l'**ESTUDI 1** el fet que les mostres van ser obtingudes en diferents fases del cicle menstrual (fol·licular i lúcia), fet que podria alterar la interpretació dels resultats obtinguts per la possible variació de l'estat inflamatori sistèmic de les dones i dels nivells de cMP al llarg del cicle menstrual. Tot i que es va fer una subanàlisi per avaluar els nivells de cMP en funció de la fase del cicle menstrual i no es van objectivar diferències estadísticament significatives, cal considerar el possible biaix dels resultats degut a la mida mostral de l'estudi. Finalment, l'avaluació dels nivells de cMP en els **dos estudis** va ser mitjançant un assaig funcional en què únicament es determinaren les cMP amb capacitat d'adhesió a l'annexina V mitjançant la fosfatidilserina expressada a la seva superfície, així com també el subtipus cMP-TF en el cas de l'**ESTUDI 1**, però no altres subtipus de cMP, pel que serien interessants més estudis en aquesta línia per valorar la possible contribució de les cMP de diferents orígens cel·lulars en la fisiopatologia de l'E. Però aquests **ESTUDIS 1 i 2** també tenen els seus punts forts, entre ells cal destacar que totes les mostres es van obtenir abans de la cirurgia, per poder avaluar d'aquesta manera els nivells plasmàtics basals dels diferents paràmetres analitzats. I, per altra banda, totes les pacients incloses en aquest estudi van ser classificades definitivament a cadascun dels grups segons les troballes intraquirúrgiques i els resultats de l'anàlisi histològic, i no segons l'orientació diagnòstica prequirúrgica, per tal de poder disposar d'un diagnòstic de certesa.

En resum, els nivells plasmàtics més elevats de cMP, però no de cMP-TF ni sTF, detectats en les pacients amb E a l'**ESTUDI 1** semblarien ser atribuïbles a les pacients amb EP, ja que no es van detectar en les pacients sense E ni en les pacients amb EO però sense EP. Aquestes troballes es van corroborar a l'**ESTUDI 2**, on també

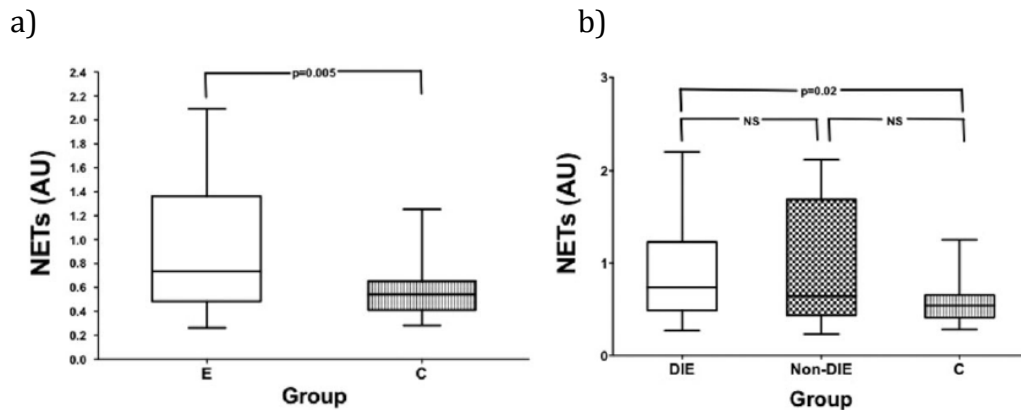
es van detectar nivells superiors de cMP en les pacients amb EP, però no en les pacients amb EO sense EP ni en les pacients sense E. A l'**ESTUDI 2**, a més, es van observar nivells més elevats de cMP en el subgrup de pacients amb EP amb una major quantitat de teixit endometriòsic, valorat com el sumatori de la mida de cadascun dels implants d'EP extirpats durant la cirurgia. No es van detectar nivells superiors de cMP en l'avaluació d'altres possibles indicadors de gravetat de la malaltia com la gravetat de la simptomatologia o l'extensió de la malaltia segons el número d'implants. De tot això es dedueix que aquest subgrup de pacients amb una major quantitat de teixit endometriòsic és el que el que presentaria un major estat inflamatori i/o d'hipercoagulabilitat i, per tant, una major gravetat de la malaltia.

Per tot això, es pot concloure que els nivells més elevats de cMP detectats en les pacients amb EP poden ser secundaris a un major estat inflamatori sistèmic d'aquestes pacients amb una forma més severa de la malaltia, en la fisiopatologia de la qual les cMP hi podrien estar implicades. En base a aquestes troballes, es va dissenyar l'**ESTUDI 3** d'aquesta tesi doctoral, on es van avaluar els nivells de NETs en les pacients amb E.

Els NETs són estructures similars a una xarxa formada per filaments de cromatina descondensada i proteïnes contingudes en els grànuls dels neutròfils, essencialment proteases com l'elastasa i MMP, i altres com la MPO, la lactoferrina i les catepsines. Es formen per un procés de mort cel·lular anomenat NETosi que tindria lloc en situacions de dany tissular i focus inflamatoris on hi hauria una acumulació de neutròfils secundària a citoquines generades per macròfags (Brinkmann et al., 2004, Pinegin et al., 2015). Inicialment descrits com a mecanismes de la immunitat innata amb una funció essencialment antimicrobiana, en els últims anys diverses línies de recerca han observat un increment en els nivells de NETs en condicions inflamatòries i/o estats d'hipercoagulabilitat, pel que els NETs podrien estar implicats en altres funcions immunitàries relacionades amb la fisiopatologia de diverses malalties inflamatòries cròniques, de manera que podrien tenir un rol en el desenvolupament i manteniment de l'estat inflamatori d'aquestes patologies. De fet, s'han descrit nivells més elevats de NETs en el lupus eritematós sistèmic, la psoriasi, l'artritis reumatoide, la malaltia de Crohn i el tromboembolisme, a part de la sèpsia (Gupta et al., 2007; Kessenbrock et al., 2009; Borisssof and ten Cate, 2011; Fuchs et al., 2012; Kaplan and Radic, 2012; Branzk and Papayannopoulos, 2013; Pinegin et al., 2015; Sørensen and Borregaard, 2016). L'E, de forma similar a altres condicions

inflamatòries i/o estats d'hipercoagulabilitat sistèmics, podria presentar nivells plasmàtics superiors de NETs. És sota aquest supòsit que es va dissenyar l'**ESTUDI 3** de la present tesi doctoral, en el que es van avaluar els nivells plasmàtics de NETs en pacients amb E i sense E, així com també en el subgrup de pacients amb EP comparant-lo amb pacients sense E i pacients amb E però sense EP. Els resultats van evidenciar nivells plasmàtics superiors de NETs en les pacients amb E que semblen ser atribuïbles a les pacients amb EP, ja que es van detectar diferències estadísticament significatives en els nivells de NETs en pacients amb EP comparat amb pacients sense E. No es van detectar, però, diferències entre les pacients sense E en comparació a les pacients amb E però sense EP ni en les pacients amb E sense EP en comparació amb les pacients amb EP, tal i com es mostra a la figura següent (Figura 4).

Figura 4. Diagrama de caixes amb els nivells plasmàtics de NETs (AU) en pacients amb E (*E group*) i sense E (*C group*) (Figura 4a) i els nivells plasmàtics de NETs en pacients amb EP (*DIE group*), pacients amb E sense EP (*non-DIE group*) i sense E (*C group*) (Figura 4b). Es mostra el valor de significació estadística en cada cas.



NETs: *neutrophil extracellular traps*; AU: unitats arbitràries; E: endometriosi; C: control; DIE: *deep infiltrating endometriosis* que és el terme en anglès per “endometriosi profunda”; NS: no significatiu.

L'**ESTUDI 3** de la present tesi doctoral és, de manera similar a l'**ESTUDI 1**, un estudi preliminar i, al nostre coneixement, el primer en avaluar els nivells plasmàtics de NETs en pacients amb E. Com ja s'ha esmentat anteriorment, en la fisiopatologia de l'E hi contribueixen diversos mecanismes, entre ells hi destaca una activació i disfunció del sistema immunitari, i s'ha observat en estudis histològics un reclutament de macròfags, cèl·lules NK i neutròfils a nivell del teixit endometriòsic, alhora que també s'ha detectat en estudis moleculars la major presència de citokines i ILs en aquestes localitzacions (Reis et al., 2013). Tot i que encara no ha estat definit el rol dels neutròfils en la fisiopatologia de l'E, seria factible, en aquest escenari descrit, que tingués lloc la formació de NETs mitjançant el procés abans esmentat, anomenat NETosi, com a conseqüència de l'activació dels neutròfils localitzats a les àrees d'implants d'E. De fet, en un estudi recent en què es van avaluar els nivells de NETs en líquid peritoneal de pacients amb i sense E, ja es van detectar nivells més elevats en les primeres (Berkes et al., 2014). Tenint en compte l'evidència científica que avui en dia considera l'E una malaltia inflamatòria sistèmica, l'objectiu del nostre **ESTUDI 3** va ser anar més enllà i valorar els nivells plasmàtics de NETs en pacients amb i sense E. Els nostres resultats podrien reflectir un major estat inflamatori sistèmic en les pacients amb E i, en concret en el subgrup de pacients amb EP, en comparació amb la resta, com ja s'ha postulat a la literatura científica (Tosti et al., 2015; Donnez, 2017; Gordts et al., 2017) i com sembla també desprendre's dels resultats obtinguts a l'**ESTUDI 1**. Berkes et al. (2014) especulen sobre un possible rol dels NETs en la fisiopatologia de l'E ja que en altres patologies inflamatòries cròniques, els NETs han estat implicats en la iniciació i manteniment de l'estat inflamatori crònic i del dany tissular secundari (Berkes et al., 2014). Els nivells elevats d'ILs i citokines que s'han observat en els implants d'E podrien ser els responsables de la migració de neutròfils i altres cèl·lules immunitàries al teixit endometrial ectòpic i provocar-ne la seva activació i, per tant, promoure la NETosi a aquestes localitzacions. En aquest context, les proteïnes incloses en els NETs (elastasa, MMP, MPO, lactoferrina i catepsines, entre d'altres) podrien contribuir a amplificar l'estat inflamatori de l'E ja que podrien estimular la secreció de citokines proinflamatòries, contribuir a la degradació de la matriu extracel·lular dels teixits on es localitzen els implants d'E i facilitar-ne, per tant, la penetració i invasió, així com també participar en processos angiogènics i antiapoptòtics. A més, els NETs també s'han implicat en processos trombogènics a través de la promoció de l'adhesió,

activació i agregació de plaquetes (Knight et al., 2012; Darrah and Andrade, 2013; Pinegin et al., 2015; Rao et al., 2015), així com també per la capacitat de reclutar cMP i cMP-TF (Martinod et al., 2014) i activar la via intrínseca de la coagulació a través del sistema de contacte (Massberg et al., 2010). Tot això podria contribuir a l'estat d'hipercoagulabilitat d'aquestes pacients i potenciar-ne encara més l'estat inflamatori i el dany tissular. Malgrat aquests mecanismes descrits pels quals s'especula que els NETs podrien participar de la fisiopatologia de l'E i, en concret de l'EP, caldrien més estudis per valorar el rol específic dels NETs en el desenvolupament i manteniment de l'EP. No obstant, sí que sembla evident, tant pels resultats obtinguts a l'**ESTUDI 3** d'aquesta tesi, com pels resultats obtinguts per altres grups de recerca (Berkes et al., 2014), que els NETs podrien reflectir un major estat inflamatori en l'E i, particularment, en l'EP, el fenotip més agressiu de la malaltia, on els mecanismes relacionats amb la inflamació, l'angiogènesi i la invasió tissular hi serien presents amb una major severitat.

El nostre **ESTUDI 3** és, però, un estudi preliminar i, per tant, caldria ampliar la recerca en aquesta temàtica per tal de confirmar els resultats obtinguts i prosseguir en la investigació del rol dels NETs en la fisiopatologia de l'EP. De forma similar a l'**ESTUDI 1**, l'**ESTUDI 3** presenta certes limitacions. Per una banda, és un estudi amb una mostra limitada i decidida de forma arbitrària tenint en compte estudis on s'han avaluat els nivells de NETs en altres patologies inflamatòries cròniques i en la pròpia E (Keshari et al., 2012; Berkes et al., 2014; Sur Chowdhury et al., 2014). Per altra banda, cal recordar que no totes les pacients que formaren el grup control eren completament sanes ja que algunes d'elles van ser intervingudes per presentar patologia annexial benigna lleu. Tot i així, i de forma similar a l'**ESTUDI 1**, considerem que aquest fet té poc risc d'esbiaixar els resultats ja que s'han obtingut diferències significatives entre el grup C i el grup de pacients amb E i, en concret amb EP i, per altra banda, altres grups de treball han publicat resultats sobre biomarcadors serològics en E amb un disseny dels grups d'estudi similar (Santulli et al., 2015), com ja s'ha esmentat prèviament. Finalment, s'ha de destacar el fet que les mostres biològiques van ser obtingudes en diferents fases del cicle menstrual (fol·licular i lúcia), fet que podria interferir en la interpretació dels resultats obtinguts per les possibles variacions en l'estat inflamatori sistèmic de les pacients. Per aquest motiu, es va realitzar una subanàlisi dels nivells de NETs en funció de la fase del cicle menstrual, en la que no es van detectar diferències estadísticament

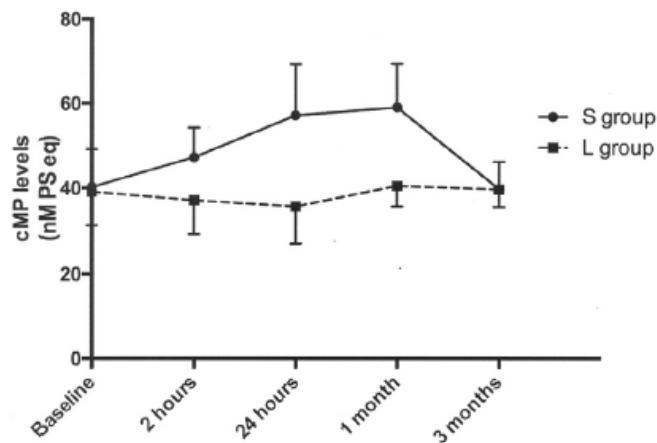
significatives. No obstant això, cal considerar la possibilitat d'un possible biaix en els resultats obtinguts en aquesta subanàlisi a causa de la mida mostral reduïda de l'estudi. Més enllà d'aquestes limitacions, el disseny de l'**ESTUDI 3** presenta com a punts forts el fet que les mostres obtingudes van ser totes en fase basal ja que es va realitzar l'extracció sanguínia abans de la cirurgia i que la inclusió definitiva de les pacients en els diferents grups de l'estudi fou en base a les observacions intraquirúrgiques i els resultats anatomopatològics i, per tant, amb un diagnòstic de certesa sobre la pertinença a cadascun dels grups de pacients.

Com a conclusió global dels **ESTUDIS 1, 2 i 3** podem afirmar que els nivells més elevats de cMP i NETs en les pacients amb E semblen ser atribuïbles a les pacients amb EP i poden reflectir un major estat inflamatori i/o d'hipercoagulabilitat en aquestes pacients, fet que seria concordant amb l'evidència científica actual que considera l'E com una condició inflamatòria sistèmica crònica en la que les pacients afectes podrien presentar un major estat d'hipercoagulabilitat. Hi ha múltiples mecanismes biològics pels quals seria clarament factible la implicació de les cMP i els NETs en la fisiopatologia de l'EP, pel que calen estudis dissenyats en aquesta direcció per explorar el rol concret d'aquests factors en l'EP.

Per altra banda, les cMP han estat descrites clàssicament com a marcadors de dany tissular. És basant-nos en aquest fet que vam dur a terme l'**ESTUDI 4** de la present tesi doctoral, per tal de valorar el grau d'inflamació i dany tissular secundaris a la cirurgia dels EO mitjançant l'anàlisi dels nivells plasmàtics de cMP en realitzar dues tècniques quirúrgiques diferents: la clàssica tècnica excisional o *stripping* i una tècnica ablativa mitjançant làser CO₂. La transcendència de la cirurgia dels EO en les pacients amb E ha estat descrita des de fa anys, ja que presenta riscos per al potencial reproductiu d'aquestes pacients, en part ja alterat per la pròpia malaltia. En aquest sentit, s'ha constatat que la cirurgia dels EO pot implicar una reducció de la reserva ovàrica per lesió del còrtex ovàric no només durant el procediment quirúrgic sinó per la inflamació secundària a la pròpia cirurgia (Sugita et al., 2013). A l'**ESTUDI 4** es van seleccionar únicament pacients amb el diagnòstic d'EO unilateral ≥ 3 cm sense EP, tributàries de ser intervingudes per referir simptomatologia (dismenorrea, dispareúnia, àlgies pelvianes cròniques i/o disquèzia) moderada i/o severa (puntuació ≥ 6 segons l'EVA) (Chapron et al., 2012; Bourdel et al., 2015) o esterilitat. En aquest estudi es va establir com a criteri d'exclusió important la presència de lesions d'EP així com d'altres patologies inflamatòries ja que, segons els

resultats obtinguts a l'**ESTUDI 1**, aquestes pacients podrien presentar nivells superiors de cMP i, per tant, dificultar la interpretació de les dades obtingudes. Les pacients incloses a l'**ESTUDI 4** van ser distribuïdes de forma aleatòria entre dos grups segons la tècnica quirúrgica utilitzada per tractar l'EO: *stripping* (grup S) o làser CO₂ (grup L). Cadascuna de les tècniques quirúrgiques aplicades està descrita detalladament a l'apartat de "Materials i Mètodes" de l'**ESTUDI 4**. En aquest estudi es van obtenir mostres de sang de les pacients incloses abans de la cirurgia, a les 2 hores, a les 24 hores, al mes i als 3 mesos de la cirurgia, i es van determinar els nivells plasmàtics de cMP en cadascun d'aquests moments i es va calcular l'àrea sota la corba generada en els dos grups de l'estudi (Figura 5).

Figura 5. Anàlisi dels nivells plasmàtics de cMP (nM PS eq) al llarg del temps (abans de la cirurgia i a les 2 hores, 24 hores, 1 mes i 3 mesos posteriors a la cirurgia) en els dos grups d'estudi (*S group* i *L group*).



cMP: micropartícules circulants; nM PS eq: equivalents nanomolars de fosfatidilserina; S: *stripping*; L: làser.

Tal i com mostra la Figura 5, el valor dels nivells plasmàtics de cMP basals i als 3 mesos dels 2 grups d'estudi va ser similar però el grup S va presentar nivells plasmàtics superiors de cMP posteriorment a la cirurgia en tots els moments analitzats en comparació amb el grup L, amb un increment d'aquests al llarg del

temps fins al mes de la cirurgia, moment en què van disminuir fins a retornar a l'estat basal. L'àrea sota la corba generada en el grup S va ser superior que en el grup L ($p < 0.05$), fet que indicaria que la generació de cMP després d'aplicar una tècnica excisional per al tractament quirúrgic dels EO seria superior que en aplicar el làser CO₂. Aquests resultats van ser independents de la lateralitat i de la mida dels EO.

La detecció de l'elevació de nivells de cMP en procediments quirúrgics ja ha estat descrita en estudis previs en el cas de cirurgies cardíaques i vasculars, hepàtiques i gastrointestinals i se suposa que podrien representar una resposta específica a l'estrès quirúrgic i estar relacionades amb l'activitat procoagulant postoperatòria alhora que podrien ser marcadors de la reacció sistèmica inflamatòria generada (Ikeda et al., 2003; Banz et al., 2016; Tempo et al., 2016).

Les cMP, com ja s'ha esmentat prèviament, han estat descrites com a marcadors de dany tissular ja que són generades per dany cel·lular, activació i/o apoptosi (Buzas et al., 2014), situacions que apareixen en circumstàncies com seria el cas de la pròpia noxa quirúrgica. Però a més, s'ha observat la seva implicació en processos biològics diversos, com la inflamació, l'hemostàsia, la immunitat, l'angiogènesi, la remodelació i la proliferació cel·lulars (Buzas et al., 2104). A nivell clínic, s'han detectat valors elevats en diverses condicions inflamatòries i protrombòtiques (Lynch and Ludlam, 2007; Barteneva et al., 2013), entre elles l'EP, segons els resultats dels nostres **ESTUDIS 1 i 2**, que estarien en relació amb tots aquests mecanismes descrits. La seva importància en la cirurgia dels EO rau, per tant, en el fet que la seva elevació, secundària al procediment quirúrgic aplicat, podria contribuir a un estat postquirúrgic inflamatori i procoagulant i a una disfunció de la resposta immunitària. En aquest estudi s'ha detectat una elevació transitòria dels valors plasmàtics de cMP en cas d'aplicar una tècnica excisional, però no en cas de tractar els EO mitjançant làser CO₂, pel que semblaria que l'*stripping* podria generar una resposta inflamatòria superior a curt termini. Tot i que als 3 mesos es va detectar un retorn dels nivells de cMP a l'estat basal, la seva elevació temporal podria ser suficient per tenir un efecte nociu sobre les pacients intervingudes. Per una banda, les cMP han estat implicades en els últims anys en processos inflamatoris per la seva capacitat per reclutar cèl·lules inflamatòries i contribuir a l'alliberació de COX2 i citoquines proinflamatòries i proteases. Però a més, s'ha descrit el seu rol en la coagulació per: a) la capacitat d'unir-se a diversos factors de la coagulació, a través de la fosfatidilserina expressada a la seva superfície, i activar-los, i b) l'expressió a la

seva superfície del TF i el PSGL-1, que facilitaran la seva unió a cèl·lules endotelials i plaquetes activades. Tot això contribuirà al desenvolupament de la cascada de la coagulació, que finalment acabarà amb la generació de trombina i posterior fibrina (Meziani et al., 2008). Però, com ja s'ha comentat al llarg de la present tesi doctoral, l'agregació i activació de plaquetes també participen de la resposta inflamatòria que es generi, ja que recentment també se les ha relacionat amb processos inflamatoris i no només hemostàtics (Jenne et al., 2013; Franco et al., 2015; Varon and Shai, 2015). Finalment, cal tenir en compte també l'efecte angiogènic de les cMP (Leroyer et al., 2010) a través de l'expressió de proteases i l'activació del PAR-2 pel complex FT/factor VIIa (Osuga et al., 2012).

Tots aquests processos podrien tenir com a conseqüència, en les pacients intervingudes d'EO, la participació en la generació d'adherències postquirúrgiques i l'afectació del teixit ovàric sa amb una subsegüent reducció de la reserva ovàrica. En relació a aquesta última consideració, recentment s'ha especulat que l'afectació de la reserva ovàrica de la pacient sotmesa a una intervenció quirúrgica d'EO seria deguda, per una banda, al propi dany quirúrgic del teixit ovàric sa adjacent i, per altra banda, al compromís vascular i a l'estat inflamatori local i sistèmic generats secundàriament a la cirurgia (Sugita et al., 2013). A més, no hem d'oblidar que la cirurgia conservadora de la fertilitat en l'E i, en concret, el tractament dels EO, presenta una elevada taxa de recurrències (Guo, 2009; Ottolina et al., 2017). Això pot tenir un efecte deleteri en les pacients amb EO ja que, a banda d'agreuja el risc d'afectació del còrtex ovàric sa en cadascuna de les intervencions, el fet de ser sotmeses a cirurgies repetitives augmenta també el nombre de complicacions quirúrgiques i el risc d'una major generació d'adherències postquirúrgiques (Vercellini et al., 2014). Per tant, en la cirurgia dels EO és important l'estudi de procediments quirúrgics efectius, però que alhora disminueixin al màxim el risc de lesió del teixit ovàric sa i minimitzin la reacció inflamatòria secundària a la cirurgia, sense incrementar el risc de recurrències de la malaltia. Per tots aquests motius, en els últims anys s'han descrit com a alternativa a l'*stripping* procediments que consisteixen en el drenatge i posterior ablació de la paret quística mitjançant la coagulació amb energia bipolar, vaporització amb làser CO₂ o, fins i tot, amb plasma (Jadoul et al., 2012). Els estudis publicats a la literatura científica en què s'han comparat les tècniques excisionals i ablatives en relació a l'afectació de la reserva ovàrica indicarien que les tècniques ablatives semblarien oferir un cert avantatge en

aquest sentit ja que descriuen, en general, una major reducció del volum ovàric i una major afectació dels marcadors de reserva ovàrica en cas de l'*stripping* (Tsolakidis et al., 2010, Roman et al., 2011; Alborzi et al., 2014, Candiani et al., 2018). A l'**ESTUDI 4** d'aquesta tesi doctoral ens hem centrat en la comparació entre *stripping* i vaporització amb làser CO₂ per al tractament quirúrgic dels EO unilaterals. Els resultats obtinguts mostren una elevació, tot i que transitòria, dels nivells de cMP en cas de tractar les pacients amb *stripping*. Aquest fet podria estar en relació a un major estat inflamatori i d'hipercoagulabilitat a nivell postquirúrgic que podria tenir, com a conseqüència, un major dany al teixit ovàric sa. A més, aquest estat inflamatori i d'hipercoagulabilitat podria contribuir també a la generació d'adherències postquirúrgiques.

Pel que fa al risc de recurrències, en una metaanàlisi del 2008 semblaria que les tècniques ablatives podrien presentar un possible increment en les recidives dels EO (Hart et al., 2008). Tot i això, estudis posteriors posarien en dubte aquesta afirmació. De fet, en un estudi aleatoritzat comparant la quistectomia i la vaporització amb làser CO₂ amb un seguiment a 5 anys, les pacients tractades amb vaporització amb làser CO₂ van presentar un major nombre de recidives i de forma més precoç, però als 5 anys no es van detectar diferències estadísticament significatives (Carmona et al., 2011). Recentment, un altre estudi comparant l'*stripping* i el tractament combinat excisional i ablatiu (Donnez et al., 2010), tampoc ha descrit diferències en les taxes de recurrències (Muzii et al., 2016). Tenint en compte tot l'exposat, l'aplicació d'una tècnica ablativa no representaria cap desavantatge en aquest sentit.

Malgrat que sembla, per tant, que les tècniques ablatives ofereixen uns millors resultats en comparació amb l'*stripping*, cal tenir en compte, però, el fet que alguns estudis apunten a un cert avantatge de les tècniques excisionals pel que fa a l'efectivitat en la reducció de les àlgies pelvianes. Tot i que hi ha pocs estudis en els que s'ha valorat aquest aspecte, semblaria que les tècniques excisionals i no les ablatives, podrien presentar millors resultats en la reducció del dolor de les pacients intervingudes (Hart et al., 2008; Pundir et al., 2017). La valoració d'aquest aspecte no forma part dels objectius inclosos en l'**ESTUDI 4** tot i que caldria considerar-lo com un punt rellevant a tenir en compte en estudis posteriors sobre tècniques quirúrgiques per al tractament dels EO per tal de valorar globalment els avantatges i inconvenients dels diversos tractaments descrits fins al moment.

Per tant, els resultats de l'**ESTUDI 4** posarien de manifest, de forma similar a estudis previs, un possible major risc d'afectació de la reserva ovàrica i de generació d'adherències postquirúrgiques en cas del tractament amb *stripping*, ja que els nivells plasmàtics superiors de cMP detectats, encara que de forma transitòria, són atribuïbles a un major dany tissular generat mitjançant aquest procediment i un major estat inflamatori i d'hipercoagulabilitat a nivell postquirúrgic. Aquest és, al nostre coneixement, el primer estudi que avalua els nivells plasmàtics de cMP generats després d'aplicar un tractament quirúrgic excisional o ablatiu a pacients amb EO. Tot i ser un estudi preliminar i amb mida de mostra reduïda, cal remarcar el fet que els criteris d'inclusió i exclusió van ser decidits i aplicats de forma molt curosa i estricta per tal d'evitar al màxim altres factors confusors que podrien alterar els nivells de cMP, entre ells s'ha de destacar l'exclusió de pacients amb EP, ja que aquest subgrup de pacients tindria nivells més elevats de cMP segons els resultats obtinguts als **ESTUDIS 1 i 2**.

L'**ESTUDI 4** presenta, també, certes limitacions. Per una banda, tal i com s'ha esmentat anteriorment, es tracta d'un estudi pilot i amb una mida mostral petita que, en no disposar d'estudis previs sobre aquesta temàtica, va ser decidida arbitràriament segons estudis prèviament descrits a la literatura científica en què s'han avaluat les cMP en altres patologies inflamatòries (Giuducci et al., 2008; Leonetti et al., 2013) així com els biomarcadors en l'E (Fassbender et al., 2013). Per altra banda, en aquest estudi no es van valorar els diversos subtipus de cMP descrits a la literatura ni altres paràmetres inflamatoris ni relacionats amb la coagulació, pel que seria interessant prosseguir la recerca en aquesta línia per tal d'obtenir una major informació sobre el rol concret de les cMP generades secundàriament al procediment quirúrgic i les seves implicacions clíniques i també de la resposta inflamatòria i procoagulant que s'esdevenen en aplicar les diverses tècniques descrites per al tractament quirúrgic dels EO. Finalment, cal remarcar que no es pot excloure el possible efecte de l'electrocoagulació en la generació de cMP en el cas de l'*stripping*. Tot i així, aquest és un procediment requerit per a l'hemostàsia quirúrgica en aquest cas, pel que la generació de cMP s'ha de considerar com un fet intrínsec i inseparable en cas d'optar per un tractament excisional i no ablatiu. De tot això es pot concloure que és necessari prosseguir la recerca en aquesta línia així com també avaluar els resultats a llarg termini en termes de reserva ovàrica, recurrències i

millora de les àlgies pelvianes de les pacients sotmeses a tractament quirúrgic dels EO per poder confirmar els nostres resultats i ampliar-ne els coneixements.

6. CONCLUSIONS I IMPLICACIONS CLÍNIQUES

Els estudis realitzats han permès arribar a les conclusions que s'exposen a continuació i que es corresponen amb els objectius esmentats a l'apartat corresponent d'aquesta tesi doctoral.

1. Les pacients amb E presenten nivells superiors de cMP i NETs en plasma en comparació amb les pacients sense E. Nivells superiors d'aquests dos factors han estat observats en múltiples patologies inflamatòries cròniques, pel que aquesta troballa reafirma el concepte de l'E com a malaltia inflamatòria sistèmica i aporta major coneixement sobre la seva fisiopatologia, ja que els nostres resultats podrien suggerir una possible implicació de les cMP i els NETs. A més, aquests dos factors podrien estar també relacionats amb l'estat d'hipercoagulabilitat que s'ha descrit en aquestes pacients per la seva implicació tant en fenòmens proinflamatoris com protrombòtics.
2. Els nivells plasmàtics superiors de cMP i NETs detectats en pacients amb E semblen atribuir-se al subgrup de pacients amb EP, ja que és en aquest subgrup on s'han detectat diferències estadísticament significatives respecte a les pacients sense E. En l'EP s'ha detectat una major expressió de factors proinflamatoris i angiogènics, pel que la troballa de nivells més elevats de cMP i NETs estaria en concordança amb aquest fet. Per tant, tot i que es tracta d'estudis pilots i és necessari prosseguir la recerca en aquesta línia, els resultats obtinguts en els estudis realitzats podrien suggerir la possible implicació de les cMP i els NETs com a dos nous mecanismes en la fisiopatologia de l'EP en concret.
3. No s'han detectat diferències en les cMP-TF ni en el sTF en les pacients amb E en comparació amb les pacients sense E. Tot i que sembla que el TF estaria relacionat amb la fisiopatologia de l'E ja que s'ha observat una major expressió de TF tant al teixit endometrial eutòpic com ectòpic, aquest fet no sembla estar relacionat amb els nivells plasmàtics de cMP-TF ni de sTF segons els resultats obtinguts al nostre estudi.
4. S'ha evidenciat que, en les pacients amb EP, els nivells plasmàtics de cMP són superiors en aquelles que presenten una major quantitat de teixit endometrial ectòpic. Aquest fet no s'ha observat en l'anàlisi d'altres factors que podrien estar

relacionats amb la gravetat de la malaltia. Aquestes troballes podrien suggerir que seria la major quantitat de teixit endometriòsic en pacients amb EP la que estaria relacionada amb un increment en la producció de cMP, com a marcador de major dany i activació cel·lular, indicant un estat proinflamatori i d'hipercoagulabilitat superior en aquesta forma més greu de la malaltia.

5. La cirurgia dels EO mitjançant una tècnica excisional (*stripping*) genera nivells plasmàtics superiors de cMP en comparació amb la vaporització amb làser CO₂. Tot i això, aquest increment de cMP sembla ser transitori ja que els nivells observats als 3 mesos de la cirurgia eren similars als de l'estat prequirúrgic. Aquests resultats suggereixen que amb la tècnica excisional es generaria una resposta inflamatòria i procoagulant major, tot i que a curt termini, en comparació amb la vaporització amb làser CO₂. Aquest fet podria estar en relació amb una major generació d'adherències postquirúrgiques i un major dany del teixit ovàric. És per aquest motiu que l'estudi de generació de cMP en la cirurgia dels EO aporta un major coneixement sobre els efectes secundaris de les diverses tècniques de què disposem a l'actualitat, per tal de minimitzar-los i poder millorar, d'aquesta manera, el maneig quirúrgic que oferim a les pacients amb E.

Com a conseqüència de tot el que hem exposat i a manera de conclusió general d'interès clínic i pràctic, amb els estudis inclosos en la present tesi, hem contribuït a la millora del coneixement de la fisiopatologia de l'E i, en concret, de l'EP, amb la descripció de possibles nous mecanismes que hi podrien estar implicats. Aquest fet hauria de permetre el desenvolupament de noves línies de recerca sobre els factors relacionats amb el seu origen, desenvolupament, manteniment i progressió i també sobre les possibles complicacions que les pacients afectades poden presentar al llarg de la seva evolució. Tot això hauria d'obrir la porta a l'estudi de nous possibles tractaments per tal d'estabilitzar la malaltia i, fins i tot, aconseguir la seva regressió. Finalment, el coneixement sobre la resposta inflamatòria generada en la cirurgia dels EO segons la tècnica aplicada, hauria de servir de referent per a l'elecció del tractament quirúrgic que oferim a les pacients tenint en compte les possibles complicacions que se'n poden derivar així com també hauria de permetre l'avenç en l'estudi i el desenvolupament de tècniques quirúrgiques en les que es minimitzi al

màxim la resposta inflamatòria generada per tal d'evitar complicacions amb implicació clínica important en les pacients amb E.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril.* 2010;94:1609-1615.
- Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol Obstet Invest.* 2006;62:139-147.
- Alborzi S, Keramati P, Younesi M, Samsami A, Dadras N. The impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve in patients with unilateral and bilateral endometriomas. *Fertil Steril.* 2014;101:427-434.
- Alderman MH 3rd, Yoder N, Taylor HS. The systemic effects of endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2017;35:263-270.
- American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997;67:817-821.
- Banz Y, Item GM, Vogt A, Rieben R, Candinas D, Beldi G. Endothelial- and platelet-derived microparticles are generated during liver resection in humans. *J Invest Surg.* 2016;29:20-31.
- Barbosa MAP, Teixeira DM, Navarro PAAS, Ferriani RA, Nastri CO, Martins WP. Impact of endometriosis and its staging on assisted reproduction outcome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44:261-278.
- Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol.* 2013;14:23.
- Bazot M, Daraï E. Diagnosis of deep endometriosis: clinical examination, ultrasonography, magnetic resonance imaging, and other techniques. *Fertil Steril.* 2017;108:886-894.
- Becker CM, Laufer MR, Stratton P, et al. WERF EPHect Working Group. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil Steril.* 2014;102:1213-1222.
- Berkes E, Oehmke F, Tinneberg HR, Preissner KT, Saffarzadeh M. Association of neutrophil extracellular traps with endometriosis-related chronic inflammation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod. Biol.* 2014;183:193-200.
- Berlac JF, Hartwell D, Skovlund CW, Langhoff-Roos J, Lidegaard Ø. Endometriosis increases the risk of obstetrical and neonatal complications. *Acta Obstet Gynecol*

Scand. 2017; 96:751-760.

- Borissoff JJ, ten Cate H. From neutrophil extracellular traps release to thrombosis: an overshooting host-defense mechanism? *J Thromb Haemost.* 2011;9:1791-1794.
- Borrelli GM, Carvalho KI, Kallas EG, Mechsner S, Baracat EC, Abrão MS. Chemokines in the pathogenesis of endometriosis and infertility. *J Reprod Immunol.* 2013;98:1-9.
- Bourdel N, Alves J, Pickering G, Ramilo I, Roman H, Canis M. Systematic review of endometriosis pain assessment: how to choose a scale? *Hum Reprod Update.* 2015;21:136-152.
- Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol.* 2013;35:513-530.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacterial. *Science.* 2004;303:1532-1535.
- Brosens I, Brosens JJ, Fusi L, Al-Sabbagh M, Kuroda K, Benagiano G. Risks of adverse pregnancy outcome in endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98:30-35.
- Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:6258-6263.
- Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2009;360:268-279.
- Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98:511-519.
- Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10:356-364.
- Candiani M, Ottolina J, Posadzka E, et al. Assessment of ovarian reserve after cystectomy versus 'one-step' laser vaporization in the treatment of ovarian endometrioma: a small randomized clinical trial. *Hum Reprod.* 2018;33:2205-2211.
- Carmona F, Martínez-Zamora MA, Rabanal A, Martínez-Román S, Balasch J. Ovarian cystectomy versus laser vaporization in the treatment of ovarian endometriomas: a randomized clinical trial with a five-year follow-up. *Fertil Steril.* 2011;96:251-254.
- Carmona F, Chapron C, Martínez-Zamora MA, et al. Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of

interleukin-8 and interleukin-6. *J Reprod Immunol*. 2012;95:80-86.

- Castellana D, Toti F, Freyssinet JM. Membrane microvesicles: macromessengers in cancer disease and progression. *Thromb Res*. 2010;125 Suppl 2:S84-88.
- Chandrasekharan UM, Waitkus M, Kinney CM, Walters-Stewart A, Dicorleto PE. Synergistic induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by thrombin and epidermal growth factor requires vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1983-1989.
- Chapron C, Santulli P, de Ziegler D, et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod*. 2012;27:702-711.
- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407, 258-264 (14 September 2000).
- Dan H, Limin F. Laparoscopic ovarian cystectomy versus fenestration/coagulation or laser vaporization for the treatment of endometriomas: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Gynecol Obstet Invest*. 2013;76:75-82.
- Darrah E, Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? *Front Immunol*. 2013;3:428.
- Date K, Ettelaie C, Maraveyas A. Tissue factor-bearing microparticles and inflammation: a potential mechanism for the development of venous thromboembolism in cancer. *J Thromb Haemost*. 2017;15:2289-2299.
- Daya S. Methodological issues in infertility research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;20:779-797.
- Ding D, Liu X, Duan J, Guo SW. Platelets are an unindicted culprit in the development of endometriosis: clinical and experimental evidence. *Hum Reprod*. 2015;30:812-832.
- Ding D, Liu X, Guo SW. Further evidence for hypercoagulability in women with ovarian endometriomas. *Reprod Sci*. 2018;25:1540-1548.
- Donnez J, Pirard C, Smets M, Jadoul P, Squifflet J. Surgical management of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:329-348.
- Donnez J, Lousse JC, Jadoul P, Donnez O, Squifflet J. Laparoscopic management of endometriomas using a combined technique of excisional (cystectomy) and ablative surgery. *Fertil Steril*. 2010;94:28-32.
- Donnez J. Introduction: From pathogenesis to therapy, deep endometriosis

remains a source of controversy. *Fertil Steril*. 2017;108:869-871.

- Du Y, Liu X, Guo SW. Platelets impair natural killer cell reactivity and function in endometriosis through multiple mechanisms. *Hum Reprod*. 2017;32:794-810.
- Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29:400-412.
- Exacoustos C, Manganaro L, Zupi E. Imaging for the evaluation of endometriosis and adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014;28:655-681.
- Falconer H. Pregnancy outcomes in women with endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2013;31:178-182.
- Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, et al. Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril*. 2013;99:1135-1145.
- Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood*. 2015;126:582-588.
- Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*. 2003;1:1655-1662.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:15880–15885.
- Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1777-1783.
- Furukawa Y, Kawano Y, Fukuda J, Matsumoto H, Narahara H. The production of vascular endothelial growth factor and metalloproteinase via protease-activated receptor in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*. 2009;91:535-541.
- Gemmill JA, Stratton P, Cleary SD, Ballweg ML, Sinaii N. Cancers, infections, and endocrine diseases in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2010;94:1627-1631.
- Gil-Bernabé AM, Lucotti S, Muschel RJ. Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br J Haematol*. 2013;162:433-441.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364:1789-1799.
- Giuducci S, Distler JH, Jüngel A, et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2845-2853.
- Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertil Steril*. 2017;108:872-885.e1.

- Gordts S, Grimbizis G, Campo R. Symptoms and classification of uterine adenomyosis, including the place of hysteroscopy in diagnosis. *Fertil Steril*. 2018; 109:380-388.
- Guerriero S, Condous G, van den Bosch T, et al. Systematic approach to sonographic evaluation of the pelvis in women with suspected endometriosis, including terms, definitions and measurements: a consensus opinion from the International Deep Endometriosis Analysis (IDEA) group. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;48:318-332.
- Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update*. 2009;15:441-461.
- Guo SW, Ding D, Geng JG, Wang L, Liu X. P-selectin as a potential therapeutic target for endometriosis. *Fertil Steril*. 2015;103:990-1000.
- Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Hahn S. Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Semin Immunopathol*. 2007;29:163-167.
- Haas D, Oppelt P, Shebl O, et al. Enzian classification: does it correlate with clinical symptoms and the rASRM score? *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013;92:562-566.
- Hamdan M, Omar SZ, Dunselman G, Cheong Y. Influence of endometriosis on assisted reproductive technology outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2015;125:79-88.
- Harb HM, Gallos ID, Chu J, Harb M, Coomarasamy A. The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2013;120:1308-1320.
- Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Apr 16;(2):CD004992.
- Hellum M, Øvstebø R, Trøseid AM, Berg JP, Brandtzaeg P, Henriksson CE. Microparticle-associated tissue factor activity measured with the Zymuphen MP-TF kit and the calibrated automated thrombogram assay. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012;23:520-526.
- Ikeda M, Iwamoto SI, Imamura H, Furukawa H, Kawasaki T. Increased platelet aggregation and production of platelet-derived microparticles after surgery for upper gastrointestinal malignancy. *J Surg Res*. 2003;115:174-183.

- Jadoul P, Kitajima M, Donnez O, Squifflet J, Donnez J. Surgical treatment of ovarian endometriomas: state of the art? *Fertil Steril*. 2012;98:556-563.
- Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*. 2013; 35:254-261.
- Jenne CN, Kubes P. Platelets in inflammation and infection. *Platelets*. 2015;26:286-292.
- Johnson NP, Hummelshoj L, Adamson GD, et al. World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis. *Hum Reprod*. 2017;32:315-324.
- Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012;189,2689-2695.
- Kaponis A, Taniguchi F, Azuma Y, et al. Current treatment of endometrioma. *Obstet Gynecol Surv*. 2015;70:183-195.
- Keragala CB, Draxler DF, McQuilten ZK, Medcalf RL. Haemostasis and innate immunity – a complementary relationship: A review of the intricate relationship between coagulation and complement pathways. *Br J Haematol*. 2018;180:782-798.
- Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e48111.
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemmarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009;15:623-625.
- Key NS, Mackman N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36:865-875.
- Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Ishimaru T. Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum. *Fertil Steril*. 2004;81:652-661.
- Kikrun G, Schatz F, Taylor H, Lockwood CH. Endometriosis and Tissue Factor. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127; 97:245-253.
- Kikrun G, Lockwood CH, Paidas MJ. Tissue factor and the endometrium: From physiology to pathology. *Trombosis Research* 124 (2009):393-96.
- Kikrun G. Endometriosis, Angiogenesis and Tissue Factor. *Scientifica*. 2012;2012:306830.
- Knight JS, Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Proteins derived from neutrophil

extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2012;3:380.

- Koninckx PR, Martin DC. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction of possibly adenomyosis externa? *Fertil Steril.* 1992;58:924-928.
- Kvaskoff M, Mu F, Terry KL, et al. Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases? *Hum Reprod Update.* 2015;21:500-516.
- Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S, Mangili G, et al. A systematic review on endometriosis during pregnancy: diagnosis, misdiagnosis, complications and outcomes. *Hum Reprod Update.* 2016;22:70-103.
- Leonetti D, Reimund JM, Tesse A, et al. Circulating microparticles from Crohn's disease patients cause endothelial and vascular dysfunctions. *PloS One.* 2013;8(9):e73088.
- Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, et al. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2010;104:456-463.
- Lin M, Weng H, Wang X, Zhou B, Yu P, Wang Y. The role of tissue factor and protease-activated receptor 2 in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2012;68:251-257.
- Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol.* 2007;137:36-48.
- Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:136-139.
- Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest.* 2012;122:2331-2336.
- Martínez-Zamora MA, Mattioli L, Parera J, et al. Increased levels of dioxin-like substances in adipose tissue in patients with deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod.* 2015;30:1059-1068.
- Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Creus M, et al. Higher levels of procoagulant microparticles in women with recurrent miscarriage are not associated with antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod.* 2016a;31:46-52.
- Martínez-Zamora MA, Tàssies D, Reverter JC, et al. Increased circulating cell-derived microparticle count is associated with recurrent implantation failure after IVF and embryo transfer. *Reprod Biomed Online.* 2016b;33:168-173.

- Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 2014;123: 2768–2776.
- Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010;16: 887–896.
- Mekar K, Masamoto H, Sugiyama H, et al. Endometriosis and pregnancy outcome: are pregnancies complicated by endometriosis a high-risk group? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;172:36-39.
- Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep.* 2008;60:75-84.
- Mircea O, Puscasiu L, Resch B, et al. Fertility outcomes after ablation using plasma energy versus cystectomy in infertile women with ovarian endometrioma: a multicentric comparative study. *J Minim Invasive Gynecol.* 2016;23:1138-1145.
- Moen MH, Stokstad T. A long-term follow-up study of women with asymptomatic endometriosis diagnosed incidentally at sterilization. *Fertil Steril.* 2002;78:773-776.
- Monsanto SP, Edwards AK, Zhou J, et al. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril.* 2016;105:968-977.
- Morel O, Hugel B, Bakouboula B et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26: 2594–2604.
- Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Tosti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol.* 2011;33:469-486.
- Muzii L, Achilli C, Bergamini V, et al. Comparison between the stripping technique and the combined excisional/ablative technique for the treatment of bilateral ovarian endometriomas: a multicentre RCT. *Hum Reprod.* 2016;31:339-344.
- 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.
- Osuga Y, Hirota Y, Yoshino O, Hirata T, Koga K, Taketani Y. Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis. *Front Biosci (Schol Ed).*

2012;4:1201-1212.

- Ottolina J, Castellano LM, Ferrari S, et al. The impact on ovarian reserve of CO₂ laser fiber vaporization in the treatment of ovarian endometrioma: a prospective clinical trial. *J Endometr Pelvic Pain Disord.* 2017;9:206-210.
- Park MS, Owen BA, Ballinger BA, et al. Quantification of hypercoagulable state after blunt trauma: microparticle and thrombin generation are increased relative to injury severity, while standard markers are not. *Surgery.* 2012;151:831-836.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21:157-171.
- Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2015;14:633-640.
- Pundir J, Omanwa K, Kovoor E, et al. Laparoscopic excision versus ablation for endometriosis-associated pain: an updated systematic review and meta-analysis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2017;24:747-756.
- Radic M, Marion TN. Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2013; 35:465-480.
- Rahmioglu N, Fassbender A, Vitonis AF, et al. WERF EPHeCT Working Group. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: III. Fluid biospecimen collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil Steril.* 2014;102:1233-1243.
- Rao AN, Kazzaz NM, Knight JS. Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World J Cardiol.* 2015; 7:829-842.
- Reis, FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum Reprod Update.* 2013;19:406-418.
- Revenfeld AL, Bæk R, Nielsen MH, Stensballe A, Varming K, Jørgensen M. Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clin Ther.* 2014;36:830-846.
- Röhrig B, du Prel JB, Wachtlin D, Kwicien R, Blettner M. Sample size calculation in clinical trials. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107:552-556.
- Roman H, Auber M, Mokdad C, et al. Ovarian endometrioma ablation using plasma energy versus cystectomy: a step toward better preservation of the ovarian

parenchyma in women wishing to conceive. *Fertil Steril*. 2011;96:1396-1400.

- Roman H, Auber M, Bourdel N, Martin C, Marpeau L, Puscasiu L. Postoperative recurrence and fertility after endometrioma ablation using plasma energy: retrospective assessment of a 3-year experience. *J Minim Invasive Gynecol*. 2013;20:573-582.
- Ruf W, Disse J, Carneiro-Lobo TC, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor and cell signalling in cancer progression and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1: 306-315.
- Saghazadeh A, Hafizi S, Rezaei N. Inflammation in venous thromboembolism. Cause or consequence? *Int Immunopharmacol*. 2015;28:655-665.
- Sampson JA. Ovarian hematomas of endometrial type (perforating hemorrhagic cysts of the ovary) and implantation adenomas of endometrial type. *Boston Med Surg J* 1922;186:445-456.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1927;14:422-469.
- Santulli P, Streuli I, Melonio I, et al. Increased serum cancer antigen-125 is a marker for severity of deep endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2015;22:275-284.
- Shah DK, Mejia RB, Lebovic DI. Effect of surgery for endometrioma on ovarian function. *J Minim Invasive Gynecol*. 2014;21:203-209.
- Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps – the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*. 2016; 126:1612-1620.
- Speroff L: Regulation of the Menstrual Cycle. In: Fritz M A; Speroff L. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 8th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2011: 199-242.
- Suades R, Padró T, Badimon L. The role of blood-borne microparticles in inflammation and hemostasis. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41:590-606.
- Sugita A, Iwase A, Goto M, et al. One-year follow-up of serum anti-müllerian hormone levels in patients with cystectomy: are different sequential changes due to different mechanisms causing damage to the ovarian reserve? *Fertil Steril*. 2013;100:516-522.e3.
- Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced

neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R122.

- Tempo JA, Englyst NA, Holloway JA, Smith DC. Platelet microvesicles (microparticles) in cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2016;30:222-228.
- Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C. Natural killer cells: key players in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2015;74:291-301.
- Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood.* 1996;88:1583-1587.
- Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic mechanisms of deep infiltrating endometriosis. *Reprod Sci.* 2015;22:1053-1059.
- Toth B, Nieuwland R, Liebhardt S, et al. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers. *Anticancer Res.* 2008;28:1107-1112.
- Tsolakidis D, Pados G, Vavilis D, et al. The impact on ovarian reserve after laparoscopic ovarian cystectomy versus three-stage management in patients with endometriomas: a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2010;94:71-77.
- Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, et al. ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis. *Zentralbl Gynakol.* 2005;127:275-281.
- Van den Bosch T, Dueholm M, Leone FP, et al. Terms, definitions and measurements to describe sonographic features of myometrium and uterine masses: a consensus opinion from the Morphological Uterus Sonographic Assessment (MUSA) group. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46:284-298.
- Van Es N, Bleker S, Sturk A, Nieuwland R. Clinical significance of tissue factor-exposing microparticles in arterial and venous thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41:718-727.
- Varon D, Shai E. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J Thromb Haemost.* 2015;13 Suppl 1:S40-46.
- Vercellini P, Frontino G, Pietropaolo G, et al. Deep endometriosis: definition, pathogenesis, and clinical management. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2004;11:153-161.
- Vercellini P, Crosignani P, Somigliana E, Viganò P, Frattaruolo MP, Fedele L.

'Waiting for Godot': a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2011;26:3-13.

- Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2014 May;10:261-275.
- Versteeg HH, Ruf W. Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32:24-32.
- Viganò P, Corti L, Berlanda N. Beyond infertility: obstetrical and postpartum complications associated with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril.* 2015; 104: 802-812.
- Viganò P, Ottolina J, Sarais V, Rebonato G, Somigliana E, Candiani M. Coagulation status in women with endometriosis. *Reprod Sci.* 2018;25:559-565.
- Wang W, Li H, Zhou Y, et al. Peripheral blood microvesicles are potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark.* 2013;13:351-357.
- Wu Q, Ding D, Liu X, Guo SW. Evidence for a hypercoagulable state in women with ovarian endometriomas. *Reprod Sci.* 2015;22:1107-1114.
- Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb J.* 2015;13:17.
- Zullo F, Spagnolo E, Saccone G, et al. Endometriosis and obstetrics complications: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2017;108:667-672.e5