

ENDOMETRIOSI: CARATTERISTICHE DEL FLUIDO PERITONEALE IN PAZIENTI INFERTILI

Davide Fusco *, Giampaolo Di Martino*, Lavinia Volpi§

*Dipartimento della Salute della Donna e Medicina territoriale, Ospedale Sant'Andrea, Sapienza Università di Roma.

§Dipartimento di Scienze Ginecologiche, Ostetriche e di Neonatologia, Università degli Studi di Parma

Indirizzo per corrispondenza: Dott. Davide Fusco

Unisapienza SC Ginecologia - Ospedale Sant'Andrea II

00100 Roma (RM) Italia

tel: +39 3287660077; fax: +39 3287660077; e-mail: davidefusco@supereva.it

ABSTRACT

Endometriosis is a chronic disease whose precise etiology is unknown. The most recent hypotheses investigate the immune involvement, particularly the inflammatory pattern which characterizes it. Among the effects of this disease cannot be forgotten the condition of infertility or, better, the condition of subfertility which it causes. The core of our work was therefore the study, in infertile patients with endometriosis, of the peritoneal microenvironment and in particular the levels of MIF found in the peritoneal fluid of these women. Therefore, were performed peritoneal fluid samples, avoiding any blood contamination, that were analyzed after an appropriate treatment and preservation, and then analyzed by ELISA immunoenzymatic analysis. The results showed a significant difference between the levels of MIF dosed in the peritoneal fluid of infertile patients with endometriosis than to those of patients in the control group.

Key words: *endometriosis; peritoneal fluid; assisted reproduction technique*

RIASSUNTO

L'endometriosi è una patologia cronica di cui non si conosce ancora a pieno l'eziopatogenesi. Le ipotesi più recenti indagano i coinvolgimenti immunitari ed in particolare il quadro infiammatorio che la caratterizza. Tra gli effetti di questa patologia, non può essere dimenticata la condizione di infertilità o quantomeno di subfertilità che provoca. Il core del nostro lavoro è stato quindi lo studio, in pazienti infertili affette da endometriosi, del microambiente peritoneale ed in particolare dei livelli di MIF riscontrabili nel fluido peritoneale di queste donne. Sono stati pertanto effettuati prelievi di fluido peritoneale, evitando ogni contaminazione ematica, sono stati analizzati previo opportuno trattamento e conservazione, e successivamente analizzati mediante analisi immunoenzimatica ELISA. I risultati hanno mostrato una significativa differenza tra i livelli di MIF riscontrabili nel fluido peritoneale di pazienti infertili con endometriosi rispetto a quelli delle pazienti appartenenti al gruppo di controllo.

Parole chiave: *endometriosi; liquido peritoneale; procreazione medicalmente assistita*

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni sempre maggiore attenzione viene posta nei confronti dell'endometriosi, tanto da considerarla una patologia d'interesse sociale, per i suoi costi sanitari, previdenziali, ma anche per i suoi effetti demografici: può essere, infatti, indiscutibilmente considerata tra le principali cause di

infertilità di coppia da fattore femminile.

Non vi è una teoria eziopatogenetica univocamente accettata, ma tanto più un coacervo delle diverse teorie fino ad oggi formulate che mettono in luce una multifattorialità. Questa stessa multifattorialità può essere riconosciuta anche nel suo ruolo patogenetico sull'infertilità (1).

Le teorie più convincenti sono quelle inerenti al

ruolo assolto dal fluido peritoneale (2), sia direttamente sulla qualità degli ovociti (3-4) e loro interazione con gli spermatozoi (5-6), sia come fattore di embriotossicità. (7-8)

Diviene pertanto di cruciale utilità valutare le caratteristiche biochimiche del fluido peritoneale nelle pazienti affette da endometriosi che non riescono a raggiungere una gravidanza, andandone a valutare alcune peculiari costituenti, tra cui notevole importanza è stata attribuita al MIF (macrophage migration inhibiting factor).

La scelta del MIF non è affatto casuale: questa chemochina svolge un ruolo importante nel mediare l'infiammazione inibendo la migrazione casuale dei macrofagi, pertanto il suo coinvolgimento nel quadro che si configura durante l'endometriosi è di prim'ordine. (9-10)

Scopo di questo studio è stato pertanto quello di:

- A. Determinare i livelli di MIF nel fluido peritoneale di donne affette da endometriosi e donne appartenenti al gruppo di controllo.
- B. Valutarne l'eventuale correlazione con i livelli di CA125 ematico
- C. Valutarne l'eventuale impatto negativo sulla fertilità.

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono state reclutate n°15 pazienti di età inferiore ai 45 anni che si sono rivolte al nostro centro per sintomatologie di interesse ginecologico e che sono state sottoposte a procedura chirurgica, sia essa laparotomica o laparoscopica.

Al fine di evitare interferenze o di sovrastimare o sottostimare i valori del MIF, sono state escluse dalla nostra casistica le pazienti affette da patologie neoplastiche o le pazienti con iperplasia endometriale; le pazienti in trattamento farmacologico *long-term* con antinfiammatori non steroidei; le pazienti affette da patologie sistemiche autoimmuni quali artrite reumatoide, LES, diabete mellito. A tutte le pazienti con endometriosi è stato riservato lo stesso trattamento chirurgico, ovvero la laparoscopia operativa. Solo in un caso questa è stata effettuata come *second time* dell'intervento, essendo stata preceduta da isteroscopia nella valutazione di adenomiosi. Per il gruppo di controllo si registrano: n°3 laparoscopie operative, n°4 miomectomie laparotomiche, n°1 isterectomia laparotomica.

Il fluido peritoneale, prelevato durante intervento

laparoscopico o laparotomico, ed avendo cura di evitare la contaminazione ematica ed escludendo i prelievi che mostrassero screzi ematici è stato posto in 2 provette di bilanciando i volumi delle due provette al fine, in un secondo momento, di poterli inserire senza ulteriori manipolazioni, nella centrifuga.

Le due provette sono state quindi poste "a sandwich" tra due confezioni di ghiaccio sintetico ed immediatamente trasportate presso il nostro laboratorio di ricerca, dove i campioni sono state posti in centrifuga a 2000 giri per 10 minuti.

Una volta terminato il processo di centrifugazione, piccole aliquote di sopranatante sono state prelevate e poste in delle provette Eppendorf e conseguentemente stoccate in congelatore con temperatura mantenuta costante a -80°C in attesa dell'analisi del MIF. Il dosaggio del CA-125 è stato eseguito presso la U.O.C. di medicina di laboratorio del nostro nosocomio.

L'analisi dei campioni di fluido peritoneale è stata eseguita nel nostro laboratorio di Diagnostica Molecolare Avanzata tramite l'utilizzo di un kit ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) Quantikine Human MIF della R&D Systems, analizzato tramite un lettore di piastre ELISA capace di misurare l'assorbanza a 450nm.

Questo sistema sfrutta la tecnica sandwich ELISA, che prevede l'utilizzo di un anticorpo purificato, definito di cattura, a cui in un secondo momento si legherà un secondo anticorpo essenziale ai fini della rilevazione della reazione.

Infine, la piastra veniva analizzata tramite lettore automatico di piastre ed i risultati elaborati tramite software informatico e riportati per le successive analisi statistiche.

L'analisi statistica è stata eseguita in prima istanza tramite analisi descrittiva dei singoli parametri, riportando media, valori massimi e minimi, deviazione standard; è stato in seguito effettuato il confronto tra il gruppo di controllo e quello delle pazienti con endometriosi tramite T-test di Student per dati non appaiati.

Sono stati considerati significativi valori $p < 0,05$.

È stato infine utilizzato l'indice di correlazione di Pearson tra CA125 ematico e MIF nel fluido peritoneale.

L'indice di correlazione vale 0 se le due variabili sono indipendenti, cresce con l'aumentare della correlazione tra le due variabile prese in esame, mentre diminuisce a valori negativi quando le due variabili sono inversamente correlate.

RISULTATI (Fig. 1)

Figura 1: Risultati dello studio

	Età (anni)		Dosaggio MIF (ng/mL)		Dosaggio CA125 (µg/mL)	
	Endometriosi (n 7/15 soggetti)	Controllo (n 8/15 soggetti)	Endometriosi* (n 7/15 soggetti)	Controllo (n 8/15 soggetti)	Endometriosi* (n 7/15 soggetti)	Controllo (n 8/15 soggetti)
	37	22	7,48	2,95	180,20	6,90
	33	37	8,84	1,65	39,90	9,12
	27	33	22,47	5,93	695,50	5,84
	37	38	8,88	2,58	115,00	6,70
	39	15	13,34	8,99	41,80	27,20
	45	38	10,01	1,08	37,74	8,13
	30	43	21,74	3,72	27,00	9,60
	-	39	-	4,20	-	6,50
Min	27	15	7,48	1,08	27,00	5,84
Max	45	43	22,47	8,99	695,50	27,20
Media	35,43	33,12	13,25	3,89	162,45	10,00
DS	6,00	9,61	6,32	2,56	241,59	7,07

A. Prevalenza

Delle n° 15 pazienti che sono state sottoposte ai nostri studi, 7 (46,67%) di queste donne con diagnosi accertata di endometriosi; le restanti 8 (53,33%) pazienti sono state considerate il gruppo di controllo, in cui sono state incluse n° 5 pazienti affette da miomatosi uterina e n° 3 neoformazioni annessiali di natura benigna

B. Età delle pazienti

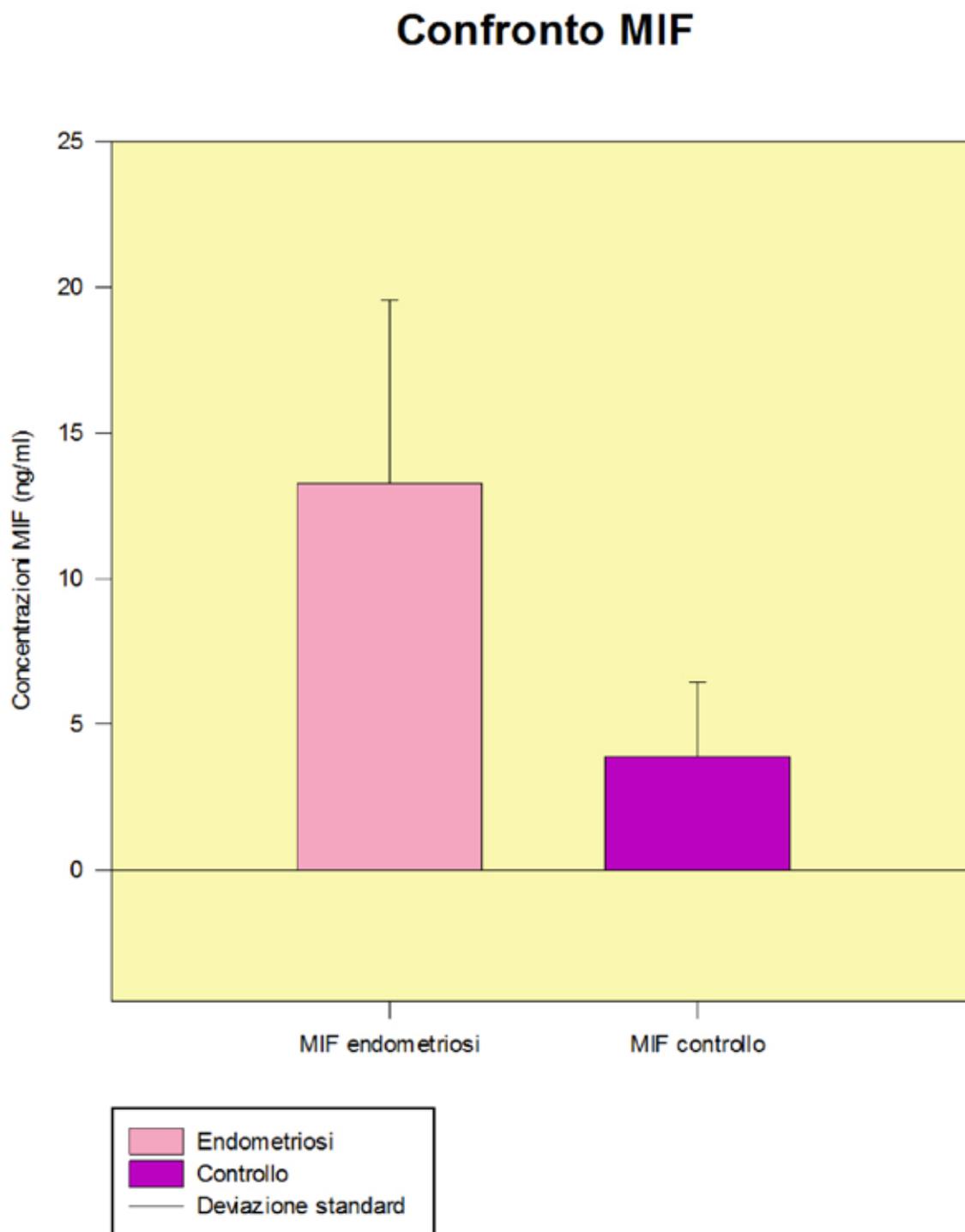
L'età media delle pazienti esaminate è di 34.2 anni. Nel dettaglio, l'età media delle pazienti endometriosiche è di 35.4 anni (deviazione

standard 6.0) e delle non endometriosiche di 33.1 anni (deviazione standard 9.6). Il confronto tra i valori non è risultato statisticamente significativo.

C. MIF nel fluido peritoneale

I valori del MIF sono risultati significativamente più elevati nelle pazienti con endometriosi (media 13.25 ng/mL; deviazione standard 6.32) rispetto alle pazienti non endometriosiche (media 3.89 ng/mL; deviazione standard 2.56) (P=0.002). (Fig.2)

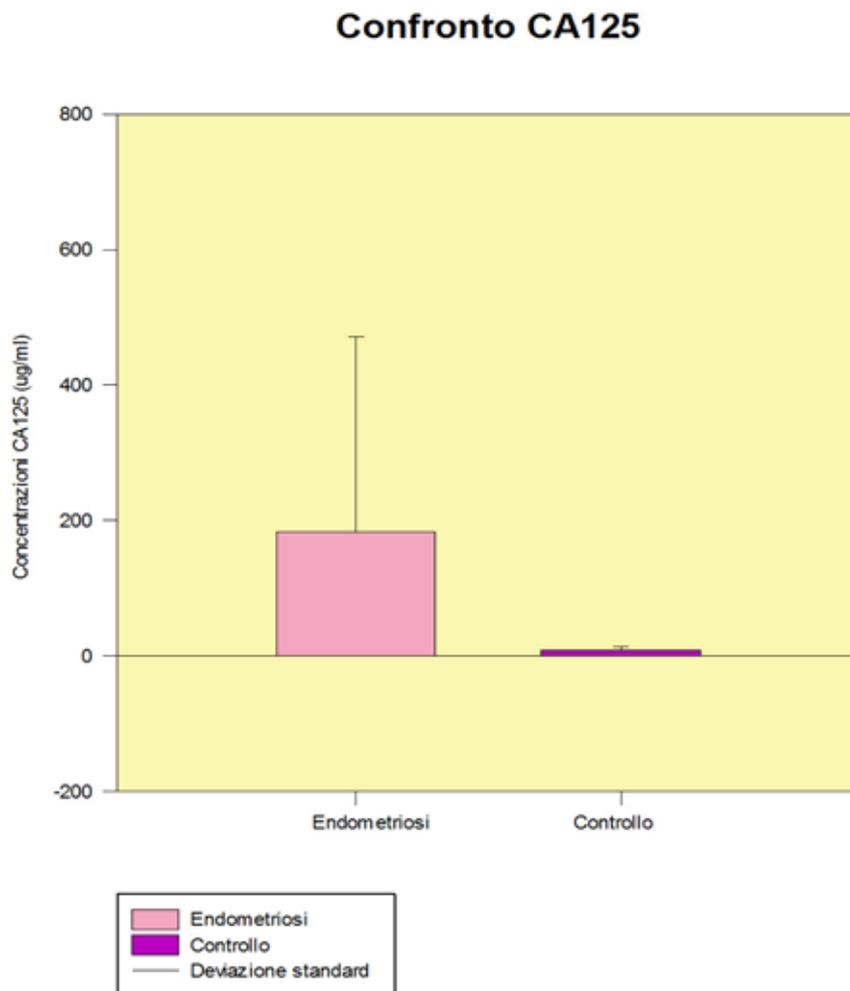
Figura 2: livelli di MIF nei due gruppi considerati



D. Ca-125 ematico

I valori del Ca-125 sono risultati significativamente più elevati nelle pazienti con endometriosi (media 162.25 $\mu\text{g/mL}$; deviazione standard 241.59) rispetto alle pazienti di controllo (media 10.00 $\mu\text{g/mL}$; deviazione standard 7.07) ($P < 0.001$).

Fig.3 Confronto dosaggio del CA125 nel sangue delle pazienti con endometriosi vs gruppo di controllo



E. Indice di correlazione tra MIF e CA125

L'indice di correlazione di Pearson tra MIF e CA125 ha mostrato una debole correlazione tra i due valori ($\chi = 0,27$)

F. Parità

Delle pazienti esaminate n°6 erano riuscite ad ottenere una gravidanza, ma di queste solo n°4 sono riuscite a condurla a termine, solo una delle suddette gravidanze è stata raggiunta da una paziente appartenente al gruppo delle endometriosiche.

I livelli di MIF mostrati da questa paziente erano molto più bassi rispetto alla media dei valori in pazienti con endometriosi.

DISCUSSIONE

Alla luce delle evidenze scientifiche riguardanti il ruolo del MIF nell'induzione del processo infiammatorio, risulta intuitivo comprendere per quale ragione questo venga, in letteratura, fortemente correlato alla patogenesi endometriosica.

Ad oggi, le segnalazioni presenti in letteratura sulla presenza di MIF nel fluido peritoneale sono scarse e non univoche (11-12).

Nello studio da noi proposto, i livelli di MIF peritoneale nelle donne con endometriosi sono risultati significativamente elevati rispetto al gruppo di controllo.

L'assenza di una correlazione statisticamente si-

gnificativa tra livelli di MIF e CA-125 (peraltro significativamente elevati rispetto ai controlli) suggerisce l'ipotesi che si tratti di markers indaganti aspetti diversificati di una stessa patologia.

L'aspetto più interessante di questo studio riguarda la possibile correlazione tra MIF e condizione di infertilità femminile. Infatti, nelle 15 donne studiate, si sono verificate sei gravidanze; di queste, cinque hanno riguardato il gruppo di controllo (tre portate a termine e due esitate in una interruzione di gravidanza) e soltanto una (esitata in interruzione di gravidanza) tra le pazienti affette da endometriosi. Peraltro questa donna presentava elevati valori di Ca-125 e valori di MIF appena al di sopra dei livelli di normalità. Tutto ciò, in disaccordo con Mahutte et al. (12) è suggestivo di un attivo, specifico ruolo del MIF nel meccanismo patogenetico dell'infertilità femminile dovuta alla condizione di endometriosi.

In particolare, il possibile coinvolgimento consiste nel fatto che:

1. Il ruolo maggiore del MIF sia giocato indirettamente sugli spermatozoi. Infatti una delle attitudini di questa sostanza, come già detto, è quello di evocare un profilo neoangiogenico tramite la secrezione di fattori angiogenici, tra cui va ricordato il VEGF che, ricordiamo, esercita un effetto diretto sulla motilità degli spermatozoi (12).
2. Altre implicazioni del MIF nell'ambito della fertilità avvengono tramite una diretta influen-

za sulla motilità degli spermatozoi. Infatti, a valori entro i range di normalità del MIF (< 6,75 ng/ml) non vi sono particolari variazioni di motilità, mentre già andando di poco sopra il cut-off del MIF per l'endometriosi, spostandosi quindi verso livelli >8 ng/ml, la motilità si riduce sensibilmente (11).

3. Oltre a ciò il MIF è stato dosato a livello endometriale in pazienti con endometriosi e senza endometriosi, mostrando livelli più elevati nel primo caso, ma sull'effetto di tale reperto sulla fertilità, vi sono pareri molto discordi. (14)

In conclusione sulla base dei risultati ottenuti ritiene di poter trarre le seguenti deduzioni:

- elevati livelli di MIF rappresentano una costante biochimica in donne affette da endometriosi.
- Non vi è una correlazione significativa tra MIF e CA125: si tratta pertanto di 2 markers di espressioni differenti della malattia endometriosa presenti pertanto in maniera indipendente l'uno dall'altro
- Il MIF sembra avere un ruolo patogenetico nel meccanismo con cui l'endometriosi determina una condizione di infertilità; naturalmente questi dati quantitativi non consentono di formulare precise ipotesi patogenetiche, ma forniscono spunti di grande interesse per futuri approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Burns WN, Schenken RS. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. *Clin Obstet Gynecol.* 1999;42(3):586-610.
2. Syrop CH, Halme J. Peritoneal fluid environment and infertility. *Fertil. Steril.* 1987;48(1):1-9.
3. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, et al. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009;7:40.
4. Yanushpolsky EH, Best CL, Jackson KV, et al. Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a prospective, case-controlled study. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1998;15(4):193-197.
5. Chacho KJ, Chacho MS, Andresen PJ, Scommegna A. Peritoneal fluid in patients with and without endometriosis: prostanooids and macrophages and their effect on the spermatozoa penetration assay. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1986;154(6):1290-1299.
6. Qiao J, Yang S, Yao Y. [Follicular fluid from patients with endometriosis decreases the binding of human sperm to zona pellucida in hemizona assay]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1998;78(2):98-100.
7. Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M. Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992;167(1):265-270.
8. Noordin L, San GTJ, Singh HJ, Othman MS, Hafizah W. Pyruvate reduces in vitro the embryotoxic effect of peritoneal fluid from infertile women with endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2008;136(1):67-73.
9. Veillat V, Carli C, Metz CN, et al. Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(12):E403-412.
10. Yang Y, Degranpré P, Kharfi A, Akoum A. Identification of macrophage migration inhibitory factor as a potent endothelial cell growth-promoting agent released by ectopic human endometrial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85(12):4721-4727.
11. Kats R, Collette T, Metz CN, Akoum A. Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 2002;78(1):69-76.
12. Mahutte NG, Matalliotakis IM, Goumenou AG, et al. Elevations in peritoneal fluid macrophage migration inhibitory factor are independent of the depth of invasion or stage of endometriosis. *Fertil. Steril.* 2004;82(1):97-101.
13. Lee T-C, Ho H-C. Effects of prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor on sperm might lead to endometriosis-associated infertility. *Fertil. Steril.* 2011;95(1):360-362.
14. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, et al. Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reprod. Biomed. Online.* 2009;18(1):85-94.