

Tesis Doctoral

Regulación del crecimiento del tejido endometrial en respuesta a nuevas alternativas terapéuticas propuestas para tratar la endometriosis

Olivares, Carla Noemí

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Olivares, Carla Noemí. (2012). Regulación del crecimiento del tejido endometrial en respuesta a nuevas alternativas terapéuticas propuestas para tratar la endometriosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Olivares, Carla Noemí. "Regulación del crecimiento del tejido endometrial en respuesta a nuevas alternativas terapéuticas propuestas para tratar la endometriosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Regulación del crecimiento del tejido endometrial en respuesta a
nuevas alternativas terapéuticas propuestas para tratar la
endometriosis**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Carla Noemí Olivares

Director de tesis: Dra. Gabriela Fabiana Meresman

Consejero de estudios: Dra: Nora Ceballos

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires, 2012

Regulación del crecimiento del tejido endometrial en respuesta a nuevas alternativas terapéuticas propuestas para tratar la endometriosis

La endometriosis se caracteriza por la presencia de focos de tejido endometrial por fuera de la cavidad uterina confiriéndole, a las mujeres que la padecen, fuertes dolores pélvicos e infertilidad. Basándonos en trabajos previos realizados en cáncer, evaluamos la aplicación de los inhibidores de aromatasa, los inhibidores de ciclooxigenasa (COX)-2 y los agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) γ como posibles alternativas terapéuticas para la endometriosis. Específicamente evaluamos los efectos del inhibidor de aromatasa, anastrozole, del inhibidor selectivo de COX-2, celecoxib y del ligando de PPAR γ , rosiglitazona sobre el crecimiento de células endometriales *in vitro* y sobre la implantación y crecimiento de lesiones endometriósicas en un modelo murino de endometriosis. Los resultados obtenidos son promisorios ya que todos los tratamientos provocaron efectos inhibitorios del desarrollo de la endometriosis así como efectos antiproliferativos, proapoptóticos y antiangiogénicos tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otro lado, luego de administrar anastrozole y celecoxib en forma conjunta, no pudimos demostrar una mejora del tratamiento combinado por sobre la aplicación de cada una de las terapéuticas de manera individual. Nuestros resultados avalan al inhibidor de COX-2 como una alternativa terapéutica concreta para la endometriosis y, sugieren que la combinación de celecoxib con una glitazona podría mejorar la involución de la endometriosis, aunque aún se requiere profundizar los estudios para confirmar estos últimos datos.

Palabras clave: Endometriosis, inhibidor de COX-2, Inhibidor de aromatasa, Agonista de PPAR γ , Proliferación celular, Apoptosis, Vascularización

Endometrial tissue growth regulation in response to new therapeutic alternatives proposed for endometriosis treatment

Endometriosis is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Women suffering from endometriosis experience pelvic pain and infertility. On the basis of previous cancer research, we evaluated aromatase inhibitors, cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ agonists as possible alternatives for endometriosis treatment. Specifically, we evaluated the effects of anastrozole, an aromatase inhibitor, celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, and rosiglitazone, a PPAR γ agonist on endometrial cell growth *in vitro* and on the implantation and growth of endometriotic lesions in a murine model of endometriosis. The results obtained are promising given that all treatments inhibited endometriosis development and had antiproliferative, proapoptotic and antiangiogenic effects both *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, after anastrozole and celecoxib combined administration we could not demonstrate an improvement over the drugs administered individually. Our results support the COX-2 inhibitor as a real option as an alternative for endometriosis treatment and suggest that celecoxib combined with a glitazone might improve endometriosis involution, although this must be further confirmed.

Key words: Endometriosis, COX-2 inhibitor, Aromatase inhibitor, PPAR γ agonist, Cell proliferation, Apoptosis, Vascularization.

Agradecimientos

A Gaby por permitirme formar parte de este grupo de trabajo de una calidad humana invaluable, por su constante apoyo y por ser una guía fundamental en esta etapa de mi carrera.

A Ine por abrirme las puertas de su laboratorio permitiendo que me desarrollara como científica y como persona.

A Mariela que me enseñó absolutamente todo, por su ayuda y compañía invaluable, por tantos momentos compartidos laborables y no tanto, siempre dispuesta a prestar manos, oídos; simplemente, porque hizo que todos los años que compartimos fuesen excelentes; porque conocí a una compañera de trabajo y me llevo una amiga entrañable.

A Anita que me enseñó muchísimo desde el primer momento en que empezó a compartir nuestros días de trabajo y lo sigue haciendo; por absolutamente TODOS los momentos que compartimos que ya perdí la cuenta; y especialmente por estos últimos meses de apoyo constante, compañía, complicidades; largos días/noches de trabajo que valieron la pena y que fueron más sencillos por haberlos compartido junto a ella. ¡Te quiero AMIGA!

A Vale por enseñarme demasiado a nivel laboral y personal; por las charlas, los consejos, las historias, los cuentos, las fantasías, las sonrisas, las carcajadas, las salidas; porque es una excelente persona que deja todo de lado para ayudar siempre que esté a su alcance y cuando no, también.

A Li, otra amiga que me llevo del IBYME, por todos los momentos que compartimos, siempre dispuesta a escuchar y dar consejos; y a Nico y a Dioni, por los martes y las carcajadas y energía de niño que llenan el corazón.

A Vani y Marin, imposible no tenerlas al lado; por los chistes, los mates, las charlas y el apoyo incondicional, por las horas de biblioteca compartidas, otra vez, hicieron que este último tramo sea mucho más fácil de transitar.

A Fer, mi amiga del alma, que aunque dejamos de compartir el día a día hace tiempo, estuvo en todo momento conmigo, los difíciles y los más lindos, por ser testigo de todos ellos.

A Pato, por las tardes de charla y mate compartidos, los consejos y la sabiduría.

A Cin y Marian, que desde lejos siguen estando presentes.

A todos los amigos que me llevo después de tantos años y unos cuantos afters compartidos filosofando sobre la vida, las carreras y tantas otras cosas: Flor, Cele, Chucky, Martín, a los Rabi y ex-Rabi, Nati, Tini, Chechu, Lara, Lucas, porque simplemente hicieron de éste un lugar increíble.

A todos y cada uno de los miembros del pasillo maravilloso que hacen que sea un placer el venir todos los días a trabajar, porque siempre encontramos una excusa para festejar torta de por medio, por los agudos cuando hay buenas noticias y por los abrazos cuando no lo son tanto.

A mi familia, Alicia, Carlos, Gastón, Julieta, Nicolás, Delfi y Tomi porque siempre me acompañaron desde un lugar muy especial.

A los Maglio, que estuvieron presentes en todo momento, un apoyo importante.

A Gonza, Raúl, Guille, Meli, Uri y Pablín porque son el mejor grupo electrógeno de amigos que pudiera tener; creo que no saben lo importantes que son para mí cada uno de ustedes.

Y a Agus, la persona más importante de mi vida, porque me ayudó a crecer y a aprender cuáles son los verdaderos valores por los cuales luchar y seguir adelante.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	7
Introducción.....	9
Endometriosis.....	9
Moléculas involucradas en la patogénesis de la endometriosis como base para el estudio de nuevas alternativas terapéuticas	20
Nuevas estrategias terapéuticas	30
Hipótesis y Objetivos.....	32
Materiales y métodos.....	34
Experimentos <i>in vitro</i>	34
Experimentos <i>in vivo</i>	41
Resultados.....	46
Efectos del inhibidor de ciclooxigenasa-2 sobre la regulación del crecimiento de células epiteliales endometriales	46
Efectos del tratamiento con los inhibidores de ciclooxigenasa-2 y aromatasa, celecoxib y anastrozole respectivamente, sobre el establecimiento y desarrollo de lesiones endometriósicas en ratón	52
Efectos del tratamiento con el inhibidor de ciclooxigenasa-2, celecoxib, y el agonista de PPAR γ , rosiglitazona, sobre el crecimiento de una línea celular epitelial endometrial.....	57
Efectos del tratamiento con el inhibidor de ciclooxigenasa-2, celecoxib, y el agonista de PPAR γ , rosiglitazona, sobre el crecimiento de tejido endometrial en un sitio ectópico en un modelo de endometriosis en ratón....	61
Discusión.....	67
Comentarios finales.....	78
Conclusión.....	80
Bibliografía.....	81

ABREVIATURAS

15-dPGJ₂: 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂

17 β -HSD: 17beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa

AA: ácido araquidónico

ADN: ácido desoxirribonucleico

AF2: dominio de activación de función de PPAR

AFS: Sociedad Americana de Fertilidad

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

AMPC: adenosín monofosfato cíclico

AromP450: aromatasa citocromo P450

ASRM: Sociedad Americana de Medicina Reproductiva

CEE: células epiteliales endometriales

COX: ciclooxigenasa

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DBD: dominio de unión al ADN

DP: receptor de prostaglandina D 2

ECC-1: línea celular de adenocarcinoma endometrial

E₁: estrona

E₂: estradiol

EP: receptor de prostaglandina E 2

ER α : receptor de estrógenos alfa

ER β : receptor de estrógenos beta

FP: receptor de prostaglandina F 2 α

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

IA: inhibidor de aromatasa

IP: receptor de prostaciclina

LBD: dominio de unión al ligando

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PAF: poliposis adenomatosa familiar

PBS: buffer fosfato salino

PG: prostaglandina

PGI₂: prostaciclina

PPAR γ : receptores activados por proliferadores de peroxisomas/peroxisomales gamma

PPRE: elemento respondedor a PPAR

PR-A: receptor A de progesterona

PR-B: receptor B de progesterona

RedP450: flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa

RXR: receptor retinoide X

TBS: buffer tris salino

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal

TP: receptor de tromboxano

TUNEL: marcación de extremos 3'OH de ADN con desoxiuridina trifosfato catalizada por la enzima TdT (del inglés, TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling)

TXA₂: tromboxano

TZD: tiazolidinediona

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

INTRODUCCIÓN

Endometriosis

Definición y prevalencia

La endometriosis se define como la presencia de focos de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina (1). Una vez en su sitio ectópico, este tejido prolifera y se vasculariza, formando los quistes o lesiones características de la enfermedad.

Los sitios más comunes donde se pueden encontrar las lesiones son: los ovarios, los ligamentos úterosacros, la fosa ovárica peritoneal, el peritoneo de fondo de saco y el septo recto-vaginal (2) (Figura 1). Sin embargo, se han descrito lesiones endometriósicas en sitios ectópicos extraordinarios como vejiga urinaria, pulmón, pleura, apéndice, recto, intestino delgado, ombligo, espacio retroperitoneal, cuello uterino y vagina (3,4).

Aproximadamente el 10% de la población femenina en edad reproductiva padece de endometriosis; existen además casos aislados de mujeres postmenopáusicas y de niñas prepúberes con anomalías uterinas que sufren de esta enfermedad (5). En mujeres que presentan problemas de infertilidad, los casos de endometriosis aumentan a 25-40% (6,7) y pueden llegar al 50% cuando, además, presentan una dismenorrea moderada a severa (8). En mujeres fértiles el padecimiento de la enfermedad varía entre el 0,5 y 5% (6). Además, otro inconveniente importante para las pacientes con endometriosis es la elevada frecuencia de recidivas luego de la finalización de los tratamientos, que varía entre el 4 y el 25% (9).



Figura 1 Diagrama de los sitios comunes de implantación de lesiones endometriósicas

Imágenes tomadas de <http://femenina-salud.com/category/endometriosis-sintomas/page/2> y <http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/endometriosis/espanol/sub2.cfm>

Síntomas y diagnóstico

Si bien se conocen casos de pacientes asintomáticas, los síntomas comúnmente asociados a la endometriosis son el dolor pélvico y la infertilidad (10). El dolor pélvico puede manifestarse en forma de dismenorrea, dispareunia o dolor crónico, e incluso si las lesiones se ubican sobre la vejiga o sobre el recto, las pacientes pueden tener episodios de disuria y proctalgia (7,11). Se ha reportado que dado que las lesiones endometriósicas responden a las hormonas sexuales de manera similar al endometrio eutópico, el dolor también puede manifestarse de forma cíclica (7).

Es sabido además, que la infertilidad y la endometriosis están altamente asociadas, llegando a afectar aproximadamente al 50% de las pacientes (12,13). Los mecanismos por los cuales gran parte de las mujeres con endometriosis son infértiles no se conocen aún con certeza. Algunas de las causas posibles propuestas para explicar el origen de la infertilidad en endometriosis son: presencia de adherencias endometriósicas que causan distorsiones anatómicas y/o impedimentos mecánicos que afectan una correcta fertilización (14), alteraciones inmunológicas y activación macrofágica en el líquido peritoneal que resulta tóxico para la función espermática o para la supervivencia embrionaria (15), defectos endometriales implantatorios y defectos en la calidad ovocitaria (16,17). Además, el dolor que experimentan algunas pacientes con lesiones infiltrantes profundas, puede ser tan fuerte, que consigue provocar largos períodos de abstinencia sexual, con la consiguiente disminución de la tasa de natalidad (18).

Asimismo, la calidad de vida de las pacientes que sufren esta enfermedad muchas veces se ve afectada debido no sólo a los fuertes dolores que padecen sino al hecho de que deben someterse a tratamientos largos e invasivos, los cuales no siempre resultan realmente efectivos (1).

En lo que respecta a la determinación de la endometriosis, debido a la naturaleza no específica de los síntomas, a la ocurrencia frecuente de los dolores pélvicos en mujeres sin endometriosis y a la superposición con otras patologías, su diagnóstico es dificultoso (7,19). El mismo se basa en la visualización directa del endometrio ectópico y su examen anátomo-patológico. Hasta la fecha, se carece de un método certero no invasivo de diagnóstico y es por eso que se recurre a la cirugía translaparoscópica para su determinación. Para realizar un diagnóstico acertado es necesario extraer y evaluar histológicamente los implantes endometriósicos (20). El hecho de que sea necesario recurrir a un método invasivo para lograr el diagnóstico de la endometriosis, ha llevado a los investigadores a la búsqueda de una forma de evaluación menos cruenta, a través de la valoración de marcadores moleculares en plasma (21,22) o a través de la puesta en práctica de una técnica adaptada de la espectrometría de masas (23). Sin embargo, hasta el momento estas propuestas no se han estandarizado y en consecuencia, la enfermedad muchas veces está subdiagnosticada.

Clasificación

La clasificación clásica de la endometriosis establecida por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM por sus siglas en inglés), plantea una categorización de la enfermedad en 4 estadios.

En el año 1979 la Sociedad Americana de Fertilidad (AFS), luego devenida en ASRM, tuvo su primera reunión y publicación en la que se determinó el criterio para la clasificación de la endometriosis (24). La última actualización de esta sistematización se realizó en el año 1996 (25).

Al momento de la laparoscopia exploratoria, se realiza una evaluación de la localización, tipo, tamaño y número de las lesiones así como de las adherencias que presenta la paciente. En base a estos datos, la ASRM establece un sistema de puntuación ponderada que determina el grado de la enfermedad. De acuerdo a los parámetros establecidos, la clasificación de la enfermedad resulta en cuatro estadios: estadio I o endometriosis mínima; estadio II o endometriosis leve; estadio III o endometriosis moderada y estadio IV o endometriosis severa. En la Figura 2 se muestra un esquema con la clasificación de la enfermedad.

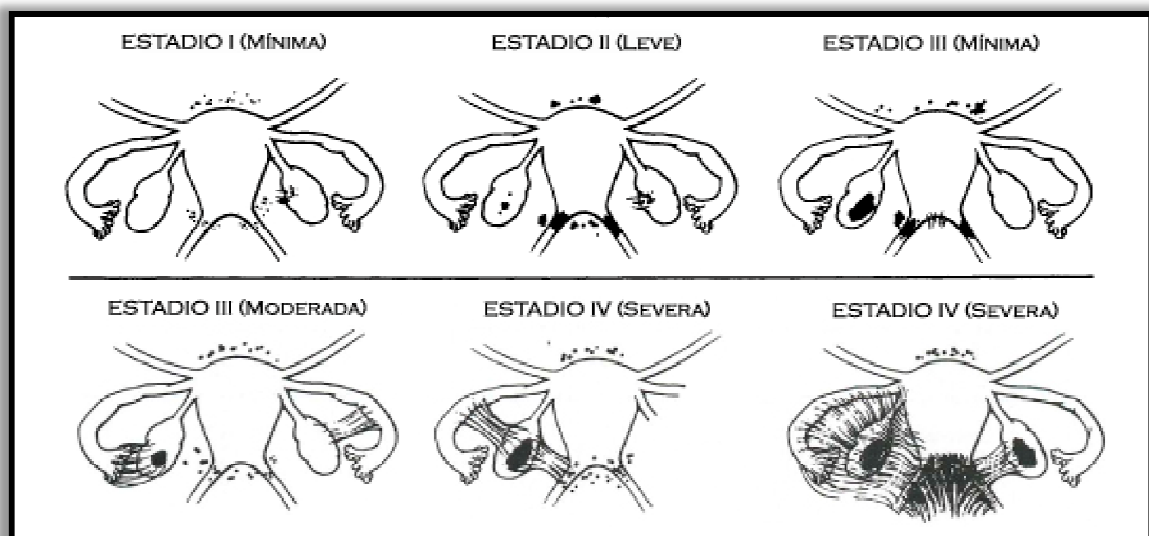


Figura 2 Clasificación de la endometriosis

Ejemplos de la aplicación de la clasificación de la endometriosis en base a la localización de lesiones y adherencias de distintos tamaños. Adaptado de la revisión de la clasificación de la enfermedad hecha en 1996 por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (25).

Etiología de la endometriosis

Hasta la actualidad no se conocen con certeza cuáles son las causas que llevan al desarrollo de esta enfermedad. Distintas teorías, algunas más aceptadas que otras, han intentado explicar la patogénesis de la endometriosis. A continuación expondré algunas de las teorías más importantes que se han propuesto para sustentar la etiología de esta patología.

Metaplasia celómica

La primera teoría altamente aceptada a principios del siglo XX fue la de metaplasia celómica. Se sabe que el epitelio celómico embrionario da origen a las células epiteliales de los ductos müllerianos y que también se diferencia en epitelios pleural y peritoneal, así como en células de la superficie de los ovarios. En base a estos antecedentes, Novak propuso que la endometriosis se originaba a partir de la membrana celómica mediante un proceso de metaplasia (26). Si bien actualmente ésta no es la teoría más aceptada para explicar las lesiones peritoneales, esta hipótesis podría explicar la aparición de lesiones endometriósicas en lugares distantes, como el tórax, así como en mujeres sin útero o en hombres (10).

Restos celulares embrionarios

La presencia de tejido endometrial ectópico podría explicarse también por la presencia de restos celulares embrionarios. Esta teoría se basa en evidencias que demuestran que existirían duplicaciones rudimentarias de ductos müllerianos de origen embrionario que podrían preservar la habilidad de proliferar y ser la fuente de lesiones endometriósicas aisladas. Sin embargo, esta teoría no es muy aceptada entre los investigadores por carecer de argumentos sólidos que la avalen (10).

Diseminación linfática y vascular

Para explicar la aparición de endometriosis en sitios distantes, se postuló que células endometriales viables podrían acceder a los sistemas linfático y vascular y así alcanzar sitios ectópicos lejanos (10). Al respecto, hay reportes que sugieren la diseminación de células endometriales por vía linfática y vascular y, aunque parece no ser una forma común, podría explicar la presencia de lesiones en áreas extraordinarias (10).

Trasplante de tejido endometrial

Esta teoría es la denominada *teoría de la implantación* y fue descrita por Sampson en el año 1927. La misma sugiere que las lesiones endometriósicas son el resultado del reflujo de tejido endometrial por menstruación retrógrada a través de las trompas de Falopio y su posterior implantación en superficies peritoneales o sobre órganos de la pelvis (27).

Las evidencias más importantes que respaldan esta teoría son: 1- la mayor parte de las mujeres presentan algún grado de menstruación retrógrada, por lo cual es común la aparición de flujo

menstrual en la cavidad peritoneal (28); 2- se han encontrado células endometriales viables en el líquido peritoneal (29); 3- se puede lograr experimentalmente que las células endometriales implanten y crezcan en la cavidad peritoneal (30); 4- hay una asociación entre la obstrucción de la salida del flujo menstrual y la endometriosis: aumenta la incidencia de endometriosis en mujeres con obstrucciones anatómicas en las vías de salida del flujo menstrual (31,32).

Entre estas cuatro teorías, la teoría de la implantación de Sampson es la más aceptada en la actualidad y parece ser la explicación de la vía de diseminación del tejido endometrial de las lesiones ginecológicas en sitios ectópicos (Figura 3).

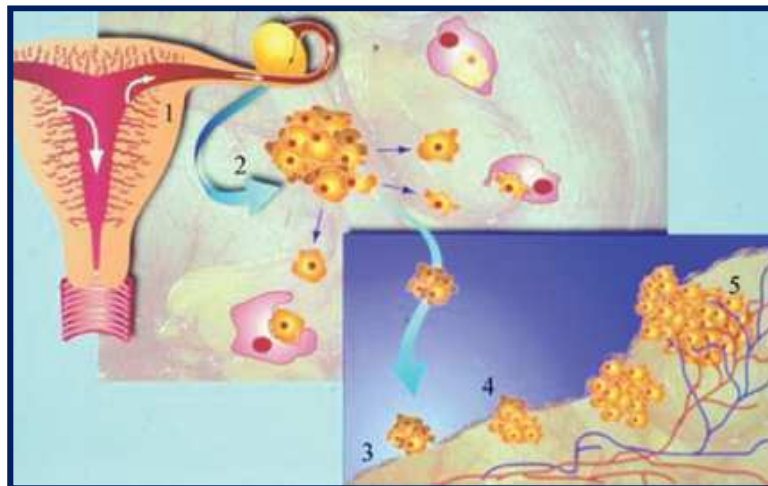


Figura 3 Esquema de la Teoría de la implantación propuesta por Sampson

En esta figura se esquematiza el transporte de las células endometriales a través de las trompas de Falopio (1) hacia la cavidad peritoneal. Allí proliferan (2-3), se adhieren (2-3) e invaden (4). Luego, a través de un proceso angiogénico, la lesión endometriósica se vale de su propia red vascular (5). Modificado de (33).

Factores de riesgo

La teoría de Sampson establece que las lesiones endometriósicas se desarrollan a partir de tejido endometrial eutópico que alcanza la cavidad peritoneal por la menstruación retrógrada. Es un hecho conocido que aproximadamente el 90% de las mujeres presentan algún grado de menstruación retrógrada (28), pero que sin embargo, sólo el 10% de la población padece de la enfermedad. Siendo así, ¿cuáles son los factores que predisponen a una mujer a desarrollar esta patología? Se han asociado diversas características al favorecimiento del desarrollo de la endometriosis y algunas de ellas describiré a continuación.

La edad en la que generalmente aparece la enfermedad es la edad reproductiva. Durante esa etapa muchas mujeres consultan al ginecólogo ante la imposibilidad de quedar embarazadas o por los fuertes dolores pélvicos. Son raros los casos de diagnóstico de la endometriosis antes de la

menarca y luego de la menopausia (34) y, aparentemente, no existiría una correlación entre la edad a la que es diagnosticada y su severidad (34).

Otros factores que estarían jugando un papel importante en el desarrollo de la enfermedad serían la intensidad del flujo menstrual así como la duración del ciclo. Las mujeres con menarca temprana, con ciclos menstruales cortos, menstruaciones prolongadas y abundantes y de paridad reducida tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad (10,34). Esto puede explicarse, de acuerdo a la teoría de la implantación, por una mayor probabilidad de acceso de tejido endometrial menstrual a la zona pélvica.

Otro factor a tener en cuenta es el hereditario. La incidencia de endometriosis en hijas o hermanas de pacientes previamente diagnosticadas es mayor que en hijas o hermanas de mujeres sanas (35-37); además se ha descrito que la enfermedad puede ser más severa en mujeres con historia familiar de endometriosis (38). En cuanto al factor genético, muchos esfuerzos se han realizado para encontrar genes candidatos a aumentar la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, entre ellos se han propuesto al glutatión-S-transferasa, N-acetiltransferasa, receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) γ , citocromo P450 y p53 (39). Sin embargo, es consenso entre los investigadores que la endometriosis es una enfermedad poligénica y multifactorial (39).

Se ha descrito además, la influencia de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad, como la exposición a dioxinas (34). No se descarta tampoco que haya una correlación entre la frecuencia de enfermedades autoinmunes y la aparición de endometriosis (34).

Crecimiento de las lesiones endometriósicas y desarrollo de la enfermedad

Si bien los factores de riesgos son predisponentes, es evidente que muchas mujeres pueden estar expuestas a ellos y que la mayoría presenta menstruación retrógrada, pero no todas desarrollan endometriosis. Esto sugiere que habría más elementos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad.

Las pacientes con endometriosis presentan alteraciones inmunológicas y hormonales que favorecen el establecimiento, implantación y crecimiento del tejido endometrial en un sitio ectópico (13).

Se ha reportado que debris celular recolectado de la cavidad peritoneal al momento de la cirugía, se adhiere y prolifera de manera más rápida *in vitro*, cuando procede de pacientes con endometriosis comparado con el mismo tejido de mujeres sanas (40). Esto indica que las mismas

características de las células endometriales juegan un papel central en la implantación y posterior desarrollo de la enfermedad; además apoya la teoría de Sampson cuya mayor objeción es el bajo porcentaje de mujeres que presentan endometriosis con respecto a aquellas que presentan sangrado hacia la cavidad peritoneal (18).

El sistema inmunológico está ampliamente involucrado en el desarrollo de esta enfermedad. En las mujeres sanas con menstruación retrógrada es este sistema el que se encarga de eliminar las células endometriales que alcanzan la cavidad peritoneal. Las pacientes con endometriosis presentan alteraciones en su sistema inmunológico y se ha propuesto que éstas favorecen la implantación del tejido endometrial en un sitio ectópico. Se sugirió que en las mujeres con endometriosis, las células endometriales provenientes del reflujo menstrual no son destruidas en forma eficiente. Esto sucedería ya sea por una incapacidad del sistema inmunológico de la paciente para responder a los antígenos endometriales, porque esos antígenos son anormales, o porque el reflujo es tan abundante que superan la capacidad de desafío de las células inmunitarias peritoneales (41). Asimismo, varios investigadores de manera independiente, han reportado defectos funcionales en la población de células citotóxicas naturales o “natural killer” (NK) periféricas y/o peritoneales provenientes de pacientes con endometriosis (42-44). Las células NK son linfocitos citotóxicos efectores que pueden reconocer e inducir la lisis de células deletéreas (34). Se desconoce si la disminución en la funcionalidad de células NK es causa o consecuencia de la endometriosis. Algunos autores postulan que esta anormalidad se produce como resultado de un estímulo antigénico prolongado, como es el caso del tejido endometrial implantado en un sitio ectópico (45) y otros consideran que se debe a factores solubles presentes en el líquido peritoneal que inhibirían la actividad de las células NK (46-48).

Los macrófagos son componentes habituales del líquido peritoneal. Su función fisiológica en la cavidad peritoneal se remite a la degradación de restos endometriales, espermatozoides y células foliculares. Las pacientes con endometriosis presentan un aumento tanto en el número de macrófagos peritoneales, como en su activación funcional (49-51). Los macrófagos activados segregan una serie de factores de crecimiento e interleuquinas que resultan de suma importancia en el proceso de la enfermedad (52,53). La interleuquina-1 β (IL-1 β) es una citoquina producida por macrófagos en estado de activación cuyos niveles se encuentran aumentados en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis y que ha sido involucrada en la alteración de la fertilidad en las pacientes que sufren esta patología (54,55).

Por otro lado, las hormonas esteroides juegan un importante papel en la patogénesis de la endometriosis. Aunque se han reportado casos de mujeres menopáusicas con endometriosis (56,57), los mismos son raros, y es aceptado que la enfermedad retrocede en esta etapa de la vida de la

mujer (58). Los datos experimentales y clínicos sugieren que los estrógenos son importantes en el crecimiento y mantenimiento de las lesiones endometriósicas (59).

En un estudio realizado por Tenenbaum y colaboradores, se observó un aumento en la concentración de estrógenos en el líquido peritoneal proveniente de pacientes de todos los estadios de la endometriosis y un aumento de los niveles de progesterona en estadios III y IV, respecto de mujeres sanas (60). Sin embargo, estos datos son controversiales ya que otros autores no han hallado diferencias significativas en la concentración de estas hormonas en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis (49).

Para explicar la mayor predisposición de algunas mujeres a desarrollar endometriosis, varios estudios se han focalizado en las diferencias de expresión de los receptores hormonales entre el tejido endometrial eutópico y el ectópico (61,62). Se hallaron polimorfismos tanto de los receptores para estradiol (61) como para los de progesterona (PR) (63,64), así como alteraciones en la expresión de PR-A y PR-B (65) en asociación con endometriosis. Sin embargo, los resultados no son concluyentes ya que existen diferencias entre los autores en cuanto al hallazgo de alteraciones de estos receptores asociadas a la endometriosis.

En los últimos años, el estudio del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis ha cobrado real importancia. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de distintos tejidos en organismos multicelulares (66). El proceso de apoptosis está involucrado en el mantenimiento del ciclo menstrual actuando activamente en la eliminación de células senescentes de la capa funcional del endometrio uterino durante la fase secretoria tardía y la fase menstrual (67). Diferentes autores han detectado anormalidades en el tejido endometrial eutópico de las pacientes con endometriosis (68-71). En ese sentido, datos previos de nuestro grupo han demostrado que las pacientes con endometriosis poseen una actividad proliferativa aumentada e índices de apoptosis disminuidos en el tejido endometrial eutópico, hechos que favorecerían su crecimiento y supervivencia en un sitio ectópico (72). Asimismo, este estudio reveló un aumento significativo en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en el endometrio de pacientes con endometriosis con respecto a las mujeres del grupo control (72). Además, se observaron niveles de apoptosis disminuidos en el endometrio ectópico comparado con el endometrio eutópico (73). Estos hechos sugieren una predisposición de las células endometriales a ser resistentes a la apoptosis y a continuar sobreviviendo, lo que tendría importantes consecuencias en el crecimiento del tejido endometrial ectópico.

Como he señalado anteriormente la endometriosis ha sido identificada como una patología dependiente de estrógenos (59,61). En ese sentido, uno de los hallazgos más relevantes ha sido la

detección de aromatasa P450, enzima responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos, en el tejido endometrial eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis (74,75). Además, se ha visto que los estrógenos estimulan la actividad de ciclooxigenasa (COX)-2 y, en consecuencia, la síntesis de prostaglandina (PG)E₂.

Se ha propuesto entonces, que la producción de estradiol (E₂) en el tejido endometriósico estaría induciendo un proceso de retroalimentación positiva hacia el aumento de transcripción de COX-2, síntesis de PGE₂ y expresión de aromatasa P450 (59,76-78). Este proceso favorecería la acumulación de estrógenos y potenciaría la inflamación.

En la Figura 4 se resumen las alteraciones más importantes halladas en las pacientes con endometriosis relacionadas con el establecimiento y desarrollo de la enfermedad.



Figura 4 Alteraciones que favorecen el desarrollo de la endometriosis

Terapéutica de la endometriosis

Hasta el momento, los tratamientos para la endometriosis se basan en la extirpación de las lesiones endometriósicas durante la laparoscopia y en el mantenimiento de un ambiente hipoestrogénico para evitar el crecimiento de las lesiones. Durante la laparoscopia exploratoria, en el momento que se obtiene material tisular para realizar el diagnóstico preciso, las lesiones son extirpadas y las adherencias, liberadas. Este es el primer paso en el tratamiento de la enfermedad.

Luego de la cirugía se puede administrar un tratamiento hormonal o no, según criterio médico. Los tratamientos hormonales incluyen los anticonceptivos orales y los análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) como tratamientos de primera línea; también se utilizan los progestágenos y, en menor medida, los agentes androgénicos.

Los anticonceptivos orales combinados, son utilizados en el tratamiento de la endometriosis ya sea en forma cíclica o continua, especialmente en mujeres jóvenes que no buscan embarazo y/o que padecen grados variables de dismenorrea. También se los utiliza como método preventivo para evitar la recurrencia de la endometriosis en pacientes que han sido tratadas quirúrgicamente, aunque la eficiencia de este tipo de tratamiento no tiene una documentación sólida en la literatura.

Los anticonceptivos orales inhiben la ovulación, disminuyen los niveles de gonadotrofinas y disminuyen el flujo menstrual (20). En estudios realizados en nuestro laboratorio se observó también que disminuyen la proliferación celular y aumentan la apoptosis del tejido endometrial eutópico proveniente de pacientes con endometriosis (79).

Las píldoras anticonceptivas son utilizadas en el tratamiento de esta patología por tener muy buena tolerancia, menor costo y menor impacto metabólico que el danazol y los agonistas de GnRH (20). Algunos efectos secundarios no deseados incluyen: sangrado irregular, ganancia de peso, hinchazón y dolores de cabeza (1). Es importante tener en cuenta también, que los anticonceptivos orales tienen un componente estrogénico y esto podría resultar en una estimulación de la enfermedad (20). Además, los que se administran en forma cíclica, al permitir la menstruación, provocarían contaminación de la cavidad peritoneal con tejido endometrial y podrían estimular el crecimiento de los implantes endometriósicos (1).

Los agonistas de GnRH se han constituido en la opción terapéutica médica más utilizada, particularmente en pacientes con dolor pélvico severo, donde esta forma de tratamiento administrada por vía inyectable y en forma mensual ha mostrado una eficacia significativa en la reducción de las lesiones (80). Los agonistas de GnRH de depósito generan un estado de hipoenstrogenemia a través de un mecanismo de supresión hipofisaria y secundariamente gonadal, lo que lleva a la atrofia de los implantes endometriósicos peritoneales. Es justo mencionar que este tipo de terapia, no ha mostrado ser eficaz en la reversión de la esterilidad, ya que luego de la finalización del tratamiento con agonistas de GnRH la tasa de embarazo no se ve modificada en comparación con las mujeres a las que se les administra placebo (81-83). Por otro lado, los agonistas de GnRH tampoco han sido eficaces como tratamiento en algunas pacientes peri o post-menopáusicas con endometriosis y dolor pélvico, ya que en estos casos la fisiopatología del mantenimiento de los

implantes estaría basada en un mecanismo extragonadal, distinto al de la producción estrogénica ovárica (1) (Figura 5).

Por su modo de acción, los agonistas de GnRH son hipoestrogénicos y provocan síntomas menopáusicos. Algunos ejemplos de estos compuestos utilizados para tratar la endometriosis son: nafarelina, busarelina y leuprolide (1). Los efectos colaterales a corto plazo incluyen sofocones, sequedad vaginal, pérdida de libido e inestabilidad emocional; asimismo utilizándolos por largos períodos de tiempo provocan disminución de la densidad ósea (5,7). Por esta razón se eligen esquemas cortos de tratamiento con agonistas de GnRH y en la actualidad se están utilizando en combinación con otros medicamentos para disminuir los efectos negativos sobre el hueso.

Las progestinas constituyen otra opción terapéutica y actúan suprimiendo el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, lo que provoca una represión de la ovulación y disminución de los niveles de estrógenos en plasma (84). Tienen efectos directos sobre el endometrio causando la atrofia tanto del tejido endometrial eutópico como de las lesiones endometriósicas (85) y se han demostrado también sus efectos antiangiogénicos (86). La eliminación del flujo menstrual, evitando la contaminación de la zona peritoneal, sumado a los efectos descritos anteriormente, resultan en un beneficio para la paciente que se somete a este tipo de tratamiento (87). Dado que estos compuestos tienen buena tolerancia y reducidos efectos metabólicos, su utilización de forma prolongada en el tratamiento de la endometriosis puede ser una alternativa apropiada si la paciente no busca el embarazo (87).

El danazol es un agente androgénico de administración oral que induce la amenorrea suprimiendo el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, aumentando la concentración sérica de andrógenos y disminuyendo la de estrógenos (5). Varios estudios realizados confirmaron la eficacia del danazol en el alivio de los dolores asociados a la endometriosis (88-90). Sin embargo, este compuesto tiene la desventaja de poseer propiedades anabólicas, lo que se traduce en efectos secundarios tales como ganancia de peso, mialgia, acné, piel grasa, bochornos e hirsutismo (91). El límite de duración del tratamiento recomendado debido a estos efectos es de seis meses, y en los últimos años su uso ha disminuido y ha sido reemplazado por las otras opciones terapéuticas mencionadas (5).

Moléculas involucradas en la patogénesis de la endometriosis como base para el estudio de nuevas alternativas terapéuticas

Aromatasa

El complejo enzimático aromatasa es el responsable de la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos. Este complejo tiene dos componentes: la aromatasa citocromo P450 (AromP450) que se encuentra acoplada a la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa (RedP450). El gen que codifica AromP450 es conocido como *CYP19*. Ambos miembros de este complejo están altamente conservados dentro de los vertebrados, especialmente en los mamíferos (92). La reacción de síntesis de estrógenos implica la aromatización de los andrógenos en una serie de pasos complejos que incluyen el consumo de oxígeno molecular y NADPH reducido, y la transferencia de electrones de moléculas donoras (93).

La RedP450 es ubicua, mientras que la expresión de AromP450 se restringe principalmente a las gónadas y al cerebro, actuando especialmente en zonas importantes para la regulación neuroendócrina de la reproducción y el comportamiento en vertebrados (93). En ovario y testículo, las hormonas folículo estimulante y luteinizante aumentan la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) lo que induce la expresión de AromP450; en el cerebro la regulación es inversa, el aumento de AMPc provoca la disminución de la expresión de AromP450 y son los mismos andrógenos los que la aumentan (94).

En humanos y otras especies además, AromP450 se expresa en otros tejidos: en el sincitiotrofoblasto de la placenta, en las células estromales adiposas, en los osteoblastos, en los fibroblastos de la piel, en la vasculatura y en varios tejidos fetales (93). Los niveles de expresión son tejido-específicos, así como lo es el promotor que regula su expresión (93). La expresión aberrante de AromP450, en tejidos que normalmente no debieran tener alta concentración de la enzima, está asociada a distintas patologías humanas como ginecomastia y sexualidad precoz (95), tumores de mama, testículo, hígado, corteza adrenal y útero (96), y endometriosis (97).

El estrógeno activo es el E_2 que es producido a partir de estrona (E_1) por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) tipo I. La 17 β -HSD tipo II es la responsable de convertir el E_2 nuevamente a su forma menos activa, E_1 . La actividad de la enzima 17 β -HSD tipo II es estimulada por la progesterona, pero se ha observado que la expresión de esta enzima es deficiente en endometriosis, por lo que se propuso que el tejido endometriósico escapa a la acción protectora mediada por la progesterona (74). La deficiencia relativa de la 17 β -HSD tipo II así como la resistencia a la acción protectora de la progesterona, contribuyen a mantener altos niveles de estrógenos

potentes a nivel de las lesiones endometriósicas y por lo tanto inducen el crecimiento y mantenimiento de las mismas (74).

Aromatasa y endometriosis

Hace algunos años Bulun y colaboradores describieron la presencia de aromatasa en el tejido ectópico y eutópico de pacientes con endometriosis, mientras que no hallaron expresión de la enzima en el endometrio eutópico de mujeres sin la enfermedad (74). También se demostró que células estromales en cultivo provenientes de implantes endometriósicos presentaban una gran actividad de aromatasa en presencia del estímulo de AMPc (98). Se realizaron además estudios para analizar qué factores estaban involucrados en la activación de la enzima y se vio que PGE₂ era el mayor inductor de su actividad (98) a través de su receptor EP2 que estimula la síntesis de AMPc (99). Se conoce también que los estrógenos sintetizados por la actividad de la aromatasa, estimulan la actividad de la enzima COX-2 produciéndose así una síntesis local de PGE₂ y estrógenos. Como consecuencia, los estrógenos que se producen localmente estimulan la proliferación celular del tejido endometriósico y la PGE₂ segregada en el ambiente peritoneal es la principal responsable del dolor, dos hechos característicos de la endometriosis (Figura 5 y Figura 7).

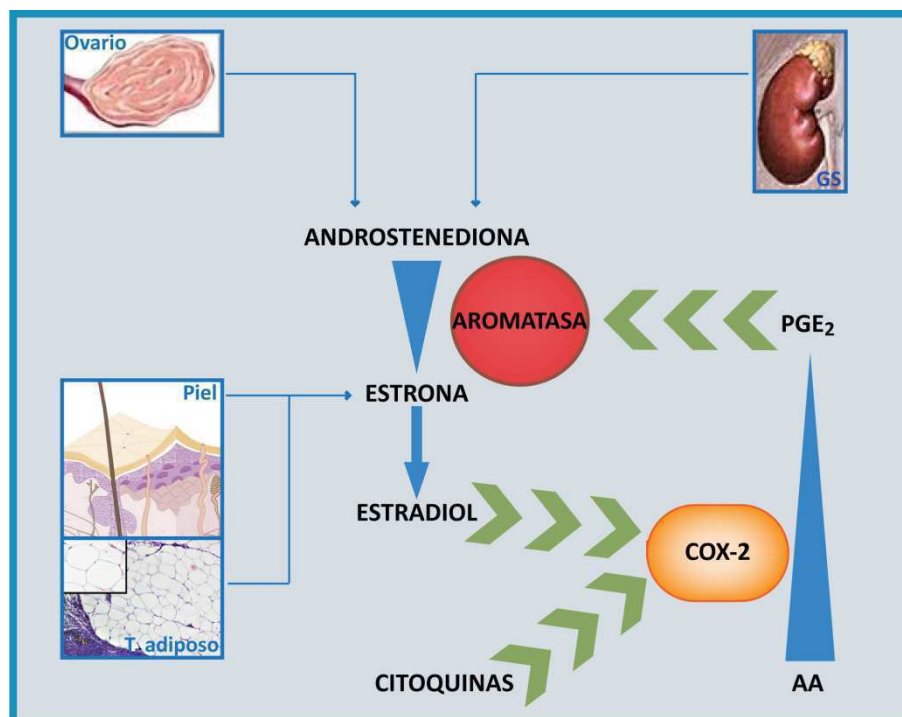


Figura 5 Aromatasa y síntesis de estrógenos

Esquema de los órganos y tejidos productores de hormonas esteroides y su acción sobre la síntesis de prostaglandinas. AA: ácido araquidónico; COX-2: ciclooxygenasa-2; PGE₂: prostaglandina E₂; GS: glándula suprarrenal; T. adiposo: tejido adiposo

Inhibidores de aromatasa

Los inhibidores de aromatasa (IAs) de última generación son drogas no esteroideas con vida media relativamente corta y con efectos reversibles. El efecto que se busca al administrar este tipo de compuestos es reducir la producción de estrógenos y, de esta manera, intentar inhibir la proliferación celular para lograr disminuir el tamaño de las lesiones endometriósicas. Como ya mencioné, los estrógenos estimulan la actividad de COX-2, y los IAs inhibirían la producción de PGE₂ y ayudarían a combatir el dolor.

Los IAs que se encuentran actualmente en el mercado, son los llamados IAs de tercera generación y presentan mayor tolerancia, biodisponibilidad, especificidad y potencia que los de primera y segunda generación (100). Entre ellos los más utilizados son: exemestane, letrozole y anastrozole.

La posible aplicación de estos compuestos en la terapéutica de la endometriosis fue inicialmente descrita por Takayama en 1998, quien reportó la aplicación de anastrozole a una paciente postmenopáusica con endometriosis severa, la cual ya había sido sometida a histerectomía y salpingo-ooforectomía bilateral (56). Luego de dos meses de tratamiento con este IA, el dolor desapareció y se logró disminuir significativamente el tamaño de las lesiones que presentaba la paciente (56). Más recientemente, otros investigadores reportaron la aplicación de letrozole en combinación con una progestina en el tratamiento de un grupo de pacientes con endometriosis. Al finalizar el protocolo con estos compuestos, no se observaron lesiones endometriósicas y el dolor había disminuido de manera significativa (57). Por otro lado, experimentos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la utilización tanto de anastrozole como de letrozole en cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis aumentaban los niveles de apoptosis y disminuían los de proliferación celular (101). Resultados similares obtuvimos cuando utilizamos estos compuestos en el tratamiento de la endometriosis inducida en un modelo de ratón; la proliferación celular disminuyó, el número de células apoptóticas aumentó en las lesiones endometriósicas y los niveles de PGE en el líquido peritoneal de los ratones se vieron disminuidos, en este último caso, solamente con el tratamiento con letrozole (102).

Recientemente Ferrero y colaboradores, realizaron un estudio exhaustivo sobre la utilización de IAs y su efecto directo sobre el dolor relacionado a la endometriosis. Los autores concluyeron que el tratamiento con letrozole y anastrozole reduce de manera efectiva el dolor experimentado por las pacientes, pero que una vez finalizado el tratamiento, el dolor reaparece. Por otra parte, se sabe que este tipo de terapéutica no puede ser utilizada a largo plazo por tener efectos negativos sobre la densidad ósea (103). En el caso de las mujeres que sufren endometriosis, se torna necesario

administrar los tratamientos de forma continua ya que hasta el momento ninguna terapia resulta efectiva en la eliminación de las recidivas. Siendo así, se ha propuesto que los IAs podrían ser utilizados siempre y cuando se combinen con terapias hormonales para reducir los efectos óseos (103).

Ciclooxigenasa-2

COX-2 pertenece a la familia de las ciclooxigenasas, enzimas responsables de la producción de PG a partir de ácido araquidónico (AA). Dos genes *COX* fueron descritos hasta el momento y están altamente conservados entre las especies. El gen de *COX-1* tiene distintas variantes de corte y empalme o “splicing”: la enzima COX-1 que es la más conocida de ellas y, las menos conocidas, COX-3 y otras proteínas más pequeñas que son variantes de COX-1 (104,105). La proteína COX-1 se expresa de manera ubicua y constitutiva. Por mucho tiempo se pensó en COX-1 como la enzima involucrada solamente en procesos fisiológicos, pero se ha demostrado su sobreexpresión en varios carcinomas y su participación en tumorigénesis (106-108). Por otro lado, se conoce una única variante de splicing para el gen de *COX-2*. La enzima COX-2 es estimulada fisiológica y patológicamente por factores de crecimiento y citoquinas e interviene en la síntesis de PGs cuando las concentraciones de AA son bajas (109).

La fosfolipasa A_2 escinde el AA de los fosfolípidos de membrana y, una vez en el citosol, las enzimas COX lo ciclan, oxigenan y reducen al intermediario PGH_2 . Existen sintetasas específicas que toman este intermediario para producir los distintos prostanoides terminales: la sintetasa de PGE_2 (PGES), sintetiza PGE_2 ; la sintetasa de $PGF_{2\alpha}$ (PGFS), sintetiza $PGF_{2\alpha}$, la sintetasa de prostaciclina (PGIS), sintetiza prostaciclina (PGI_2), la sintetasa de PGD_2 (PGDS), sintetiza PGD_2 , y la sintetasa de tromboxano (TXS), sintetiza tromboxano (TX) A_2 (Figura 6).

Una vez sintetizados, los prostanoides son rápidamente exportados fuera de la célula a través de un transportador de PGs y actúan muy cerca de su lugar de liberación de manera autocrina o paracrina. Sus funciones biológicas las realizan a través de receptores específicos para cada prostanoides, estos receptores son de la familia de los receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G. DP, EP, FP, IP y TP son los receptores para PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 y TXA_2 , respectivamente. Hasta el momento se conocen 4 subtipos para EP (EP1-4) cada uno de los cuales está codificado por un gen distinto, y EP3 tiene 8 variantes de splicing lo que le otorga una gran variabilidad en las funciones que realiza PGE_2 . Por otro lado, los receptores TP y FP tienen dos variantes de splicing cada uno (109). En la Figura 6 se resumen las acciones de cada uno de estos prostanoides.

Las PGs son lípidos bioactivos que poseen múltiples y variadas funciones. En biología reproductiva se ha encontrado que participan en la regulación de la ovulación, en la fisiología endometrial y en el proceso de menstruación (77). Se ha visto que en procesos patológicos muchas veces la expresión de COX-2 se encuentra aumentada, como en distintos tipos de cáncer (mama, próstata, vejiga, páncreas, pulmón, colon), donde su alta expresión correlaciona con un mal pronóstico para el paciente. Por otro lado en otros procesos inflamatorios, como en adenomiosis y endometriosis, también su expresión se ha hallado incrementada (110-112).

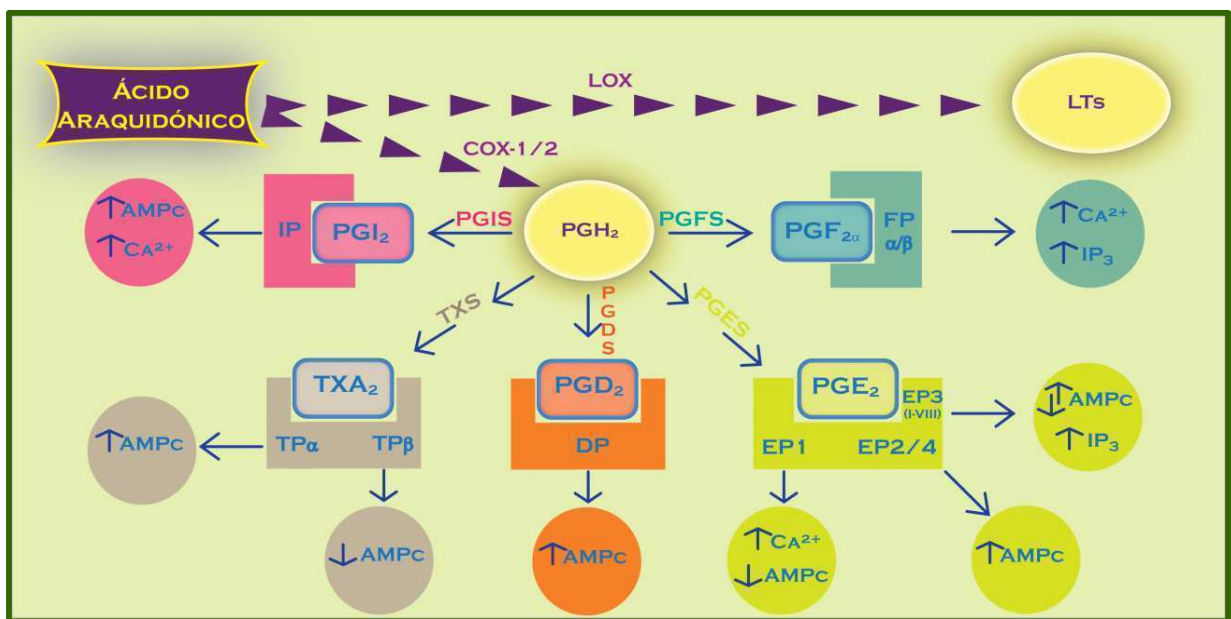


Figura 6 Esquema de la síntesis de prostaglandinas y sus vías de señalización

El ácido araquidónico es el precursor de la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas. Cada prostaglandina se une a un receptor de siete pasos transmembrana específico y dispara una cascada de señales característica. LOX: lipoxigenasa; LTs: leucotrienos; COX-1/2: ciclooxigenasa-1/2; PGI₂: prostaciclina; PGIS: sintetasa de prostaciclina; TXA₂: tromboxano A₂; TXS: sintetasa de TXA₂; PGD₂: prostaglandina D₂; PGDS: sintetasa de PGD₂; PGE₂: prostaglandina E₂; PGES: sintetasa de PGE₂; PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}; PGFS: sintetasa de PGF_{2α}; IP, TPα/β, DP, EP1-EP4, FPα/β: receptores específicos de cada prostaglandina; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; Ca²⁺: calcio; IP₃: inositol trifosfato.

Ciclooxigenasa-2 y endometriosis

De manera similar al hallazgo de la expresión aumentada de aromatasa en endometriosis, el descubrimiento de la sobreexpresión de la enzima COX-2 en pacientes con la enfermedad respecto a mujeres controles, fue un hecho sumamente importante. La presencia de estas dos enzimas claves en la síntesis de estrógenos y de PGE₂ explica en gran parte el estado de activa proliferación de las lesiones endometriósicas y los fuertes dolores que experimentan las pacientes.

Tanto en la fase proliferativa como en la secretoria del ciclo menstrual, COX-2 se encuentra altamente expresada en pacientes con endometriosis comparado con mujeres sin la enfermedad (112). Asimismo, Wu y colaboradores describieron que COX-2 se expresa en células estromales y epiteliales provenientes de pacientes con endometriosis y confirmaron que su expresión es mayor en mujeres que sufren de esta patología (113).

Los niveles elevados de PGs que se encuentran en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis son principalmente producidos por los macrófagos peritoneales y el tejido endometriósico (49,50,113,114), que poseen una expresión aumentada de esta enzima con respecto a mujeres controles (112,113,115,116).

Los altos niveles de PGs, no sólo favorecen la proliferación celular estimulando la actividad de aromatasas con su consiguiente producción de estrógenos, sino que además los mismos estrógenos, aumentan la síntesis de PGE₂ estimulando la actividad de COX-2 (117).

PGE₂ además estimula la producción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (118,119). Esta molécula es central para la formación de una red vascular nueva en la lesión endometriósica, lo que resulta indispensable para su desarrollo y crecimiento. Se describió además, que pacientes con endometriosis poseen concentraciones elevadas de VEGF en el líquido peritoneal (120) y que además este factor es capaz de estimular la expresión de COX-2 (121).

De esta forma, se establece un círculo de retroalimentación positiva en el que intervienen aromatasas, estrógenos, COX-2, PGE₂ y VEGF; todos ellos interrelacionados de manera tal que se activan y aumentan la producción y/o actividad de los otros, y estimulan la proliferación celular, la angiogénesis, la inflamación y por consiguiente, el dolor (Figura 7).

Inhibidores de ciclooxigenasa-2

Los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) son una gran familia de drogas que inhiben la actividad de las COXs disminuyendo la producción de PGs y, en consecuencia, el dolor. Son comúnmente utilizados para el tratamiento de todo tipo de dolencia. Entre ellos se encuentran: ibuprofeno, naproxeno, aspirina, diclofenac. Todos estos compuestos inhiben de manera indiscriminada la actividad de las dos isoformas de COX y no es un evento raro que a largo plazo produzcan efectos secundarios adversos como una úlcera gastrointestinal debido a la inhibición de la actividad de COX-1 (122). Justamente para hacer frente a estos efectos, se desarrollaron inhibidores específicos de COX-2, que fueron llamados coxibs. Los coxibs desde su desarrollo fueron y son utilizados en el tratamiento de la artritis. Celecoxib pertenece a esta categoría de AINEs que inhiben

de manera selectiva a COX-2. Otros coxibs como valdecoxib o rofecoxib fueron desarrollados, pero luego fueron retirados del mercado por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos por causar efectos cardiovasculares adversos. Celecoxib no ha sido aprobado aún para ser utilizado en el tratamiento de la endometriosis y no se han realizado estudios que evalúen su capacidad antiinflamatoria en mujeres que sufren la enfermedad.

A nivel experimental, hay una considerable cantidad de estudios realizados en los que se evaluó el efecto de la inhibición de las COX respecto al desarrollo de la endometriosis *in vivo* con buenos resultados sobre la involución de la enfermedad (123-125). Asimismo existen antecedentes en distintos modelos de cáncer que advierten sobre sus efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapoptóticos (126,127). Hoy en día, celecoxib está aprobado para el tratamiento de poliposis adenomatosa familiar y como adyuvante en el tratamiento de cáncer de mama (128-131).

Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) fueron inicialmente descritos en ratón (132) y en *Xenopus* (133).

En mamíferos, se han descrito tres clases de receptores: PPAR- α , PPAR- β/δ y PPAR- γ , que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares. Este tipo de receptores se caracterizan por tener una estructura altamente conservada en forma de módulos en los que uno de ellos corresponde a un dominio de unión al ADN (DBD) y otro, a un dominio de unión al ligando (LBD). Dentro del LBD en la zona carboxiterminal, se encuentra el dominio de activación de función del receptor denominado AF2 (134). El DBD consiste en una estructura de dos dedos de zinc que se unen específicamente al elemento respondedor a PPAR en el ADN cuando el receptor se encuentra activado y se trasloca al núcleo (134).

Los PPARs activos forman heterodímeros con el receptor retinoide X (RXR), del que también se han descrito tres isotipos (α , β y γ) (135). Cualquiera de los tres isotipos del RXR se activa por el mismo ligando: el ácido retinoico 9-*cis* (136). Una vez activo, el complejo PPAR:RXR se vale de cofactores para ejercer su actividad sobre el ADN: ya sea para inhibir la expresión de un gen o para activar la misma, intervienen coactivadores y correpresores (134). Cualquiera de los dos componentes de este complejo que haya interactuado con su agonista, es suficiente para heterodimerizar con la contraparte y llevar el complejo activo al núcleo (137). Si ambas partes están unidas a su ligando el complejo también cumple su función, pero en este caso el efecto es aditivo (137).

Los PPARs se expresan en una gran variedad de tejidos: sistema nervioso central, corazón, colon, intestinos delgado y grueso, músculo esquelético, bazo, páncreas, riñón, hígado, vasos, piel, hipófisis, en tejidos reproductivos: ovario, testículo, útero, próstata, glándula mamaria y principalmente en tejido adiposo (134,137-139). Los ligandos naturales de los PPARs son los ácidos grasos y los eicosanoides, pero también existe una variedad de compuestos sintéticos agonistas de estos receptores. A continuación describiré brevemente los ligandos de cada una de las isoformas:

PPAR α

Este receptor puede activarse tanto por ácidos grasos saturados como insaturados, entre ellos: ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico y AA (134). El rol que tendría este receptor en los tejidos en los que se expresa sería el de censar los ácidos grasos libres que se encuentran en la célula (134). Entre sus ligandos sintéticos se encuentran: GW7647, L165041 y, el de menor potencia, GW501516 (140).

PPAR β/δ

Este receptor también puede activarse por ácidos saturados o insaturados: ácido palmítico y sus análogos metabólicamente estables, AA y ácido eicosapentanoico (ambos con baja afinidad); también pueden activarlo los eicosanoides PGD₂ y PGA₁ (134). GW501516 y L165041 son agonistas completos, mientras que GW7647 es un agonista parcial, todos ellos sintéticos (140).

PPAR γ

El isotipo γ tiene mayor afinidad por los ácidos grasos poliinsaturados: ácido linoleico, ácido linolénico, AA, ácido eicosapentanoico; así como por 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15-dPGJ₂) que es un derivado de PGD₂ y el fosfolípido hexadecil-azeloil-fosfatidilcolina (134). Los fármacos desarrollados que agonizan este receptor incluyen a las tiazolidinedionas (TZDs) o glitazonas. Los más estudiados son GW7647 y rosiglitazona, agonistas completos; pioglitazona y L165041, agonistas prácticamente completos, y en menor medida ciglitazona y GW 501516 (140).

En un trabajo de Froment y colaboradores se resume la implicancia de los PPARs en reproducción. Si bien la supresión del PPAR α no tendría efecto sobre la fertilidad en ratones, la eliminación de las isoformas β/δ y γ provoca comprobadas alteraciones (139): la delección tejido-específica de PPAR γ en ovarios, células epiteliales y linfocitos lleva a una reducción de la fertilidad en

ratones (141). Este efecto se debería a una disminución en el número de embriones implantados por reducción en la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo y no a un cambio en la foliculogénesis o en la tasa de ovulación (141). De esta manera, se relaciona la producción de esteroides con la actividad de los PPARs, en particular de PPAR γ , aunque esta asociación es en muchos casos, controversial. Hay estudios que indican que la activación de PPAR γ *in vitro* con distintas TZDs estimula la secreción tanto de progesterona como de estradiol en células de la granulosa de rata y oveja, en células luteínicas bovinas y en células de la teca porcinas (139); mientras que la secreción de los mismos esteroides es inhibida en células de la granulosa porcinas y humanas provenientes de pacientes que realizaron protocolos de fertilización *in vitro* (139).

Receptores activados por proliferadores de peroxisomas y endometriosis

Se ha descrito la presencia de PPAR γ en células estromales y epiteliales de lesiones endometriósicas de pacientes con endometriosis (142) y de endometrio eutópico de mujeres infértiles (143). Se ha estudiado el rol que podría cumplir esta molécula en el dolor, la inflamación, y en el proceso de adherencia de las células endometriósicas al peritoneo. En cuanto al dolor, se encontró una correlación positiva entre este fenómeno y la expresión proteica de PPAR γ en el caso de pacientes que presentaban lesiones peritoneales, aunque no se correlacionó con el estadio de la enfermedad (142) (Figura 7).

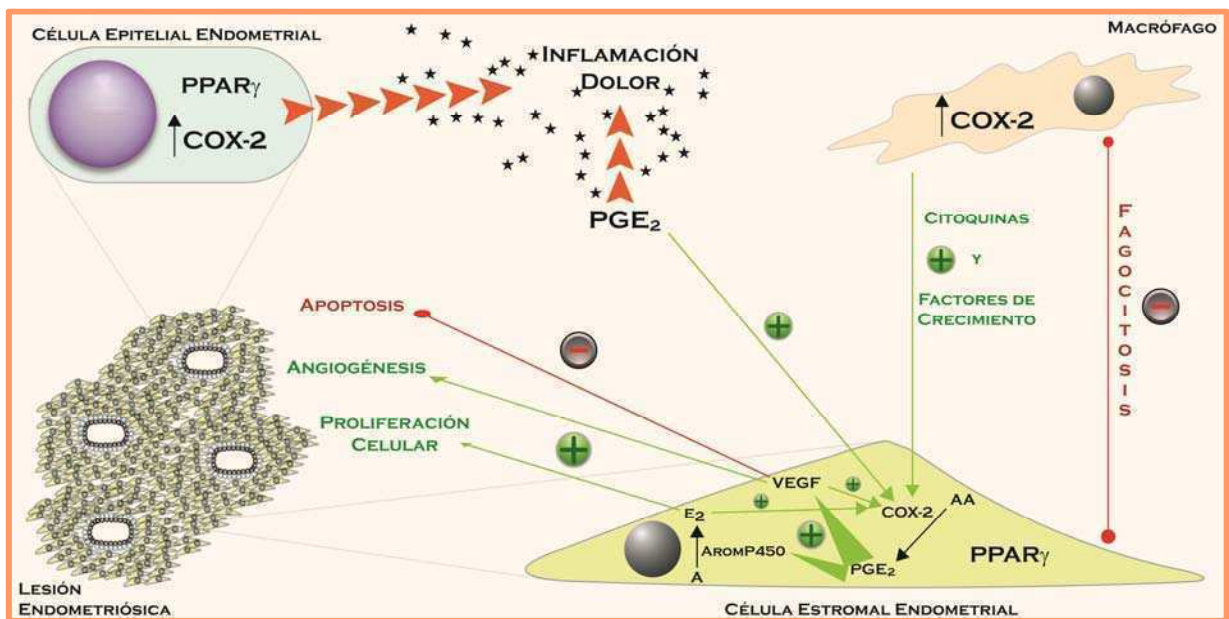


Figura 7 Ambiente peritoneal en endometriosis

Los macrófagos peritoneales sintetizan y liberan PGE_2 además de citoquinas y factores de crecimiento, como $IL-1\beta$ y $VEGF$. Todos estos factores estimulan la expresión y/o actividad de $COX-2$ produciéndose de esa manera concentraciones aún más altas de PGE_2 en el ambiente peritoneal. PGE_2 estimula la expresión del factor proangiogénico $VEGF$ y de aromatasa, aumentando la síntesis de E_2 y, en consecuencia, la proliferación celular endometriósica. El resultado de estas interacciones implica niveles de angiogénesis e inflamación aumentados y de apoptosis disminuidos. PGE_2 también disminuye la capacidad fagocítica de los macrófagos impidiendo la fagocitosis del tejido endometrial que alcanzó la cavidad peritoneal de forma retrógrada, y permitiendo la implantación y proliferación de la lesión endometriósica. A: androstenediona; AA: ácido araquidónico; AromP450: aromatasa P450; $COX-2$: ciclooxigenasa-2; E_2 : estradiol; PGE_2 : prostaglandina E_2 ; $VEGF$: factor de crecimiento de endotelio vascular; $PPAR\gamma$: receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma.

Agonistas de $PPAR\gamma$

Los agonistas de $PPAR\gamma$ son las llamadas TZDs entre ellas: ciglitazona, rosiglitazona, pioglitazona, troglitazona. Estos compuestos son ligandos sintéticos del receptor nuclear. Se sabe que al unirse a su ligando, el receptor es activado y entre otras consecuencias, se aumenta la sensibilidad de la célula a la insulina. Por este hecho, es que estas drogas son ampliamente utilizadas en el tratamiento de la insulino-resistencia asociada a la diabetes tipo II.

Más tarde se estudió el efecto de estos ligandos sobre el crecimiento tumoral en distintos tipos de cáncer y se vio que tanto *in vitro* como *in vivo* tenían efectos beneficiosos sobre la inhibición del crecimiento de los tumores (144-146). Asimismo se demostró que la inhibición del crecimiento tumoral provocada por las TZDs era mediada por la inhibición de la proliferación endotelial, y en consecuencia por una disminución de la angiogénesis en el tumor (146).

Por otro lado, se sabe que la activación de PPAR γ disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias en cáncer (147) y es esperable que este efecto ocurra de igual manera en una enfermedad inflamatoria como es la endometriosis. Recientemente, se describió que en células estromales endometriales en cultivo estimuladas con TZDs se disminuye la síntesis y secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 de manera independiente de PPAR γ (148). En cuanto a la inflamación, también se vio que el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis es un fuerte quimioattractante de monocitos y que esta actividad disminuye significativamente cuando se agrega una TZD (149).

Se estudió también la implicancia de la activación de PPAR γ en la unión de una línea celular epitelial endometrial a una monocapa de una línea celular mesotelial y se vio que el tratamiento previo de ambos tipos celulares con una TZD, provocaba una disminución significativa de la adherencia de las células endometriales a las mesoteliales (150).

Se evaluó además la eficacia de estas drogas en distintos modelos de endometriosis. *In vitro* se demostró que las TZDs inhiben la proliferación de células endometriósicas humanas (151) y disminuyen la expresión de VEGF (152). En modelos animales se comprobó que el tratamiento con TZDs reduce el tamaño de la endometriosis experimental en rata (153,154) y en babuinos (155).

Nuevas estrategias terapéuticas

En los últimos años se ha pensado en el tratamiento de distintas enfermedades apuntando a más de una molécula como blanco. Esto se debe a que en muchos casos la combinación de dos o más compuestos, resulta más efectiva que la utilización de cualquiera de esas mismas drogas por separado. Más aún, en algunos casos se pueden acortar los tiempos de tratamiento, disminuyendo también algunos efectos colaterales adversos provocados por la administración de las drogas a largo plazo.

Los compuestos con los que trabajamos en nuestro laboratorio se han estudiado para el tratamiento contra el cáncer y es en este tipo de enfermedades en que la combinación de más de una droga ha tenido muy buenos resultados. En particular la combinación de AINEs tanto con los IAs así como con los agonistas de PPAR γ , se han utilizado con éxito en distintos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de cáncer (129,156-163). En líneas generales estos tratamientos han demostrado

tener efectos antiproliferativos, proapoptóticos y antiangiogénicos provocando una disminución en el tamaño y en la progresión del proceso tumoral. En ese sentido, hace algunos años se publicó un ensayo clínico que reportó que la combinación de exemestane con celecoxib podría tener un efecto benéfico adicional en el tratamiento de cáncer de mama avanzado (163). En este trabajo se comparó el efecto de exemestane administrado junto a celecoxib, contra el tratamiento con exemestane solo o con letrozole solo. Los resultados que se obtuvieron sugieren una mejora con el tratamiento combinado en la reducción del cáncer y en la recuperación general de los pacientes (163). Sin embargo, en otro estudio de fase II realizado por Dirix y colaboradores donde se evaluó la combinación de exemestane con celecoxib versus exemestane solo, se encontró que los beneficios clínicos obtenidos fueron similares en los dos grupos evaluados (164). En un trabajo de recopilación de datos de distintos ensayos clínicos publicado por Falandry y colaboradores, concluyeron que la terapia combinada de exemestane y celecoxib tiene una eficacia y seguridad promisorias en el tratamiento del cáncer de mama metastásico (129).

En cuanto a la combinación de AINEs con ligandos de PPAR γ también se hicieron varios estudios en cáncer. Se conoce que los inhibidores de COX-2 son agonistas débiles de PPAR γ (165). En un trabajo publicado por Mustafa y colaboradores, se reportó que el tratamiento combinado de celecoxib y un agonista de PPAR γ , F-L-Leu, retarda significativamente la aparición de tumores en un modelo de cáncer de mama espontáneo (159). Más recientemente, en un modelo de carcinoma pancreático humano *in vitro*, se combinó otro inhibidor de COX-2, NS-398, con rosiglitazona y se describió un aumento en los niveles de apoptosis y una disminución en la proliferación celular (160). En endometriosis se realizó un estudio *in vitro* que fue dirigido simultáneamente a activar PPAR γ y RXR en células estromales endometriales humanas inmortalizadas obteniendo una inhibición sinérgica de la proliferación celular (166).

Sin embargo, hasta el momento, no se ha estudiado la eficacia de la combinación de un inhibidor de COX-2 con un agonista de PPAR γ , así como tampoco la combinación de un inhibidor de COX-2 con un IA, en el tratamiento de la endometriosis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

En base a los antecedentes previamente descritos en cáncer y dada la similitud de los mecanismos involucrados en la inducción de la endometriosis con los procesos que conducen al desarrollo de las enfermedades neoplásicas, la hipótesis de este trabajo plantea que ***los inhibidores de aromatasa, los inhibidores de COX-2 y los agonistas de PPAR γ controlan el crecimiento endometrial en endometriosis y que la combinación de ambos inhibidores, así como la administración conjunta del inhibidor de COX-2 con el agonista de PPAR γ , mejora esta respuesta en comparación con cualquiera de esos tratamientos por separado.***

Objetivos

La problemática de la terapéutica habitual de la endometriosis se basa en que los tratamientos disponibles en la actualidad no controlan las causas de la enfermedad sino que sólo mejoran sus síntomas. Por lo tanto, en cuanto se discontinúa el tratamiento, es muy común que la enfermedad retorne y que se dificulte su control definitivo.

La intención de búsqueda de tratamientos que tengan como blanco moléculas involucradas en la etiopatogenia de la endometriosis, sumado a las evidencias que indicaban que la inhibición de COX-2, la inhibición de aromatasa y la activación de PPAR γ poseían efectos beneficiosos sobre el control del crecimiento tumoral, nos llevaron a proponer los objetivos de esta tesis doctoral.

Inicialmente nos planteamos evaluar el efecto del inhibidor selectivo de COX-2, celecoxib, en un modelo *in vitro* de cultivo primario de células endometriales provenientes de pacientes con endometriosis. Consideramos como objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del inhibidor de COX-2 sobre el crecimiento de las células endometriales de pacientes con endometriosis.
- Evaluar si la inhibición del crecimiento celular provocada por celecoxib se debe a la disminución de la actividad de COX-2.
- Evaluar si la inducción de la vía intrínseca de regulación de la apoptosis está involucrada en la muerte celular estimulada por el inhibidor de COX-2.
- Evaluar los efectos del inhibidor de COX-2 sobre la síntesis del factor proangiogénico VEGF.

Para complementar los estudios realizados *in vitro*, quisimos probar el efecto de celecoxib en un modelo de endometriosis *in vivo*.

Además, basándonos en resultados previos obtenidos *in vitro* e *in vivo* en el laboratorio y en datos bibliográficos, quisimos incorporar al análisis al inhibidor de aromatasa, anastrozole, y estudiar su combinación con celecoxib, en un modelo animal de endometriosis. Es así que consideramos:

- Evaluar los efectos de celecoxib y anastrozole, por separado y combinados, sobre el desarrollo de la endometriosis en un modelo experimental en ratón.
- Investigar el mecanismo de acción de la inhibición del crecimiento endometrial inducida por celecoxib y anastrozole en el modelo de endometriosis desarrollado en ratón.

Para continuar quisimos incorporar la evaluación del agonista de PPAR γ , rosiglitazona, estudiando su acción de manera individual y en combinación con celecoxib. Para ello decidimos ampliar el modelo experimental y trabajar con una línea celular epitelial endometrial, donde evaluamos el efecto de estas dos drogas, consideradas como nuevas alternativas terapéuticas para la endometriosis. Específicamente nos propusimos:

- Evaluar los efectos de celecoxib y rosiglitazona, por separado y combinados, sobre la proliferación de la línea celular epitelial endometrial ECC-1.
- Evaluar los efectos de celecoxib y rosiglitazona sobre la apoptosis de la línea celular ECC-1 y sobre proteínas involucradas en este proceso.

Para complementar estos estudios realizados *in vitro*, quisimos probar el efecto de estas drogas en un modelo de endometriosis *in vivo*. Siendo así, consideramos:

- Evaluar los efectos de celecoxib y rosiglitazona, por separado y combinados, sobre el crecimiento del tejido endometrial en un modelo de endometriosis inducida en ratón.
- Investigar el mecanismo de acción de la inhibición del crecimiento endometrial, inducida por celecoxib, rosiglitazona y su combinación.
- Evaluar si los efectos provocados por celecoxib son generados por la inhibición de la actividad de COX-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimentos *in vitro*

Pacientes

Se seleccionaron pacientes en edad reproductiva que acudieron al Servicio de Ginecología del Hospital de Clínicas “Gral. San Martín” y al Centro de Ginecología y Reproducción (CEGYR). Previo consentimiento escrito de las pacientes, se extrajeron muestras de biopsias de endometrio durante las laparoscopias con cureta de Novak (Bioteque America Inc.) durante la fase proliferativa de acuerdo a lo descrito anteriormente (167). Las biopsias de endometrio se tomaron con el propósito de su evaluación diagnóstica por anatomía patológica (Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Clínicas y CEGYR) y se destinó una parte de ellas para este trabajo. Para el procesamiento de los cultivos primarios, se dispusieron las biopsias en tubos estériles con medio de cultivo DMEM-F-12 (Gibco) conteniendo 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina B (Gibco). Se contó con dos grupos:

Pacientes con endometriosis: 21 pacientes se diagnosticaron laparoscópicamente y confirmaron por estudios histológicos. Se seleccionaron pacientes que padecían endometriosis mínima y leve (estadio I y II) (25).

Mujeres sin endometriosis: el grupo control consistió en 13 mujeres que no padecían endometriosis y que se sometieron a laparoscopías diagnósticas por infertilidad, obstrucción de trompas u otra patología de origen no infeccioso ni oncológico que pudiera alterar la población celular a evaluar.

El presente proyecto fue aprobado por los comités de ética del IBYME y del Hospital de Clínicas.

Aislamiento y cultivo de células epiteliales de endometrio humano

Se siguió la técnica descrita anteriormente (167). Se disgregó la biopsia de tejido endometrial eutópico con material de cirugía, se colocó la muestra en medio de cultivo DMEM-F-12 con 1 mg/ml de colagenasa (tipo I, Gibco) y se incubó durante dos horas en estufa gaseada a 37°C y 5% CO₂. Se centrifugó la suspensión de células 5 minutos a 100 xg, se descartó el sobrenadante, se

resuspendió el sedimento con medio de cultivo y se centrifugó por otros 5 minutos a 100 xg. Para asegurarnos de la pureza del sedimento, se sembró en placas de cultivo plásticas durante 30 minutos para hacer un pegado selectivo de fibroblastos contaminantes. El grado de pureza se evaluó previamente por la presencia de citoqueratina, proteína típica de la fracción epitelial, por técnicas de inmunocitoquímica (167).

Evaluación de la proliferación celular

Luego de purificar las células epiteliales endometriales (CEEs), se sembraron 5×10^4 células por pocillo en placas plásticas de 96 pocillos (Corning Inc.) y se incubaron con medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco). Luego de 48 horas se lavó el cultivo con buffer fosfato salino (PBS) y se agregó celecoxib (Pfizer) 10, 20, 25, 40, 50, 75 y 100 μM al medio de cultivo fresco suplementado con 2,5% de SFB. Al basal se le agregó DMSO 1 $\mu\text{l/ml}$ (Sigma) que fue el vehículo para reconstituir el celecoxib. Las células se incubaron por otras 48 horas. Veinticuatro horas antes de la cosecha se agregó 1 μCi de ^3H -timidina (Nen, Dupont) a cada pocillo. Las células se cosecharon con un cosechador automático (Nunc Cell Harvester 8), los filtros se colocaron en tubos Polistor de polipropileno de 4 ml de capacidad y se les agregó líquido de centelleo (Optiphase HISAFE 3, Perkin Elmer). Se evaluó la síntesis de ADN por incorporación de ^3H -timidina midiendo la radiactividad en un contador de centelleo líquido automático (168).

Para evaluar si la adición de PGE_2 exógena lograba revertir los efectos de celecoxib sobre la proliferación celular de las CEE, se estimularon las células con 50 μM del inhibidor de COX-2 y PGE_2 (200-2000 pg/ml) y se procedió a la evaluación de la proliferación celular del mismo modo que en el caso anterior. En todos los casos, los datos se expresaron como porcentaje del basal, media \pm SEM.

Evaluación de la apoptosis

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ CEEs por pocillo en placas plásticas Lab-Tek de 8 pocillos (Nalge Nunc International). Luego de cultivar durante 48 horas las CEEs, se agregó celecoxib (10, 20, 25, 40, 50, 75 y 100 μM) al medio DMEM-F-12 2,5% SFB o DMSO 1 $\mu\text{l/ml}$ (basal). Luego de 48 horas de incubación se evaluaron los niveles de apoptosis utilizando la técnica de naranja de acridina y bromuro de etidio.

La naranja de acridina es un colorante vital que es excluido de las células viables y específico para la muerte celular por apoptosis (169,170). Luego de lavar el cultivo se agregó naranja de acridina (4 $\mu\text{g/ml}$) y bromuro de etidio (4 $\mu\text{g/ml}$) y se contaron un total de 300 células por pocillo en microscopio de fluorescencia (Ex: 450-490, Em: 515). Los datos se expresaron como veces de aumento de células apoptóticas, células que presentaban núcleo teñido de anaranjado (apoptóticas

tempranas + tardías) sobre número total de células, respecto al basal sin celecoxib. Los resultados se expresaron como veces de aumento del basal, media \pm SEM.

Evaluación de la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis

Luego de purificar las CEEs, se sembraron 1×10^6 células por pocillo en placas plásticas de 6 pocillos (Corning Inc.) y se incubaron con medio de cultivo con 10% SFB. Luego de 48 horas, se agregó celecoxib 25, 50, 100 μ M al medio de cultivo suplementado con 2,5% SFB o DMSO 1 μ l/ml. Las células se incubaron por otras 24 horas. Se retiró y guardó a -20°C el sobrenadante de cada tratamiento (para la evaluación posterior de VEGF), se levantaron las células raspándolas con un rastrillo a 4°C en buffer lisis (Tris HCl 50 mmol pH 7,5, EDTA 1 mmol, EGTA 1 mmol, NaCl 150 mmol, glicerol 10%, NP40 1%, MgCl₂ 1 mmol, SDS 0,1%) con 1:500 de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) y se guardaron a -70°C . Al momento de realizar la cuantificación de proteínas, se descongelaron las muestras, se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 16000 xg, se separó el sobrenadante y se descartó el sedimento. Se cuantificó la concentración de proteínas presentes en el sobrenadante mediante la técnica de Bradford (171).

Se estudió la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 por Western blot en homogenatos proteicos de cultivos de CEEs tratados con celecoxib (25, 50, 100 μ M) o DMSO 1 μ l/ml (basal). Se utilizó la expresión de tubulina como control de carga. Bax y Bcl-2 son dos proteínas pro y antiapoptótica respectivamente, claves en la susceptibilidad apoptótica por la vía intrínseca.

De cada muestra se tomó una alícuota conteniendo 20 μ g de proteínas totales y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% durante 90 minutos a 150 V. Se transfirieron las bandas proteicas resultantes a una membrana de nitrocelulosa de 2 μ m (Hybond ECL, Amersham Biosciences). Los productos proteicos se identificaron con los anticuerpos primarios detallados en la tabla 1 mediante procedimientos estándar de Western blot. Se trató la membrana con una solución de leche descremada 5% en TBS Tween 0,1% (TBST 0,1%) para bloquear el pegado inespecífico y se incubó con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. El bloqueo de la membrana para el posterior revelado de tubulina se hizo con una solución de leche descremada 5% en PBS Tween 0,1% (PBST 0,1%).

Luego de la incubación se realizaron seis lavados por 5 minutos cada uno con TBST 0,1% (o PBST 0,1%). Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la tabla 2, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en TBST 0,1% (o PBST 0,1%). Se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno en TBST 0,1% (o PBST 0,1%) y un lavado de 5 minutos en TBS (o PBS). La visualización de las bandas se realizó por quimioluminiscencia, utilizando el kit Western Lightning

Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Inc) en el sistema G-Box (Syngene); capturándose las imágenes con el software GeneSnap (Syngene). La cuantificación se realizó mediante el análisis densitométrico de las bandas, utilizando el software ImageJ, normalizadas con la expresión de tubulina en cada calle. Los datos se expresaron como porcentaje del basal, media \pm SEM.

Evaluación de los niveles de VEGF

Se evaluaron los niveles de VEGF en los sobrenadantes de los cultivos de CEEs de pacientes con endometriosis tratados con celecoxib (25, 50 y 100 μ M) mediante la técnica de ELISA utilizando un kit comercial y siguiendo los procedimientos detallados por el fabricante (Cytelisa, Human VEGF kit, EL-V, Cytimmune). Los medios condicionados se centrifugaron y se congeló el sobrenadante a -20°C hasta su evaluación. Utilizando alícuotas de estos sobrenadantes se continuó con la cuantificación de los niveles de VEGF según los procedimientos descritos por el proveedor del producto. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro de placas (Labsystems Multiscan) a 490 nm. Los resultados se obtuvieron en pg/ml y se expresaron como porcentaje del basal, media \pm SEM.

Descripción de la línea celular ECC-1 (ATCC CRL-2923)

Esta línea celular fue desarrollada por Satyaswaroop y colaboradores a través del pasaje de un linaje endometrial humano bien diferenciado proveniente de un adenocarcinoma a ratones desnudos (172). Las células ECC-1 responden a la estimulación por parte del factor de crecimiento epitelial (EGF) expresando proteínas luminales conocidas y pueden ser utilizadas en el estudio de regulación endocrina y paracrina del epitelio endometrial *in vitro* (173).

La línea celular ECC-1 es del tipo epitelial/luminal, responde a las hormonas esteroideas ya que expresa los receptores de estrógenos tanto α como β , los receptores de tipo A y B de progesterona, receptores de andrógenos, así como receptores para interferón gamma (IFN) γ (173-175). Además ECC-1 ha demostrado mantenerse estable en sucesivos pasajes y constituye un excelente modelo de trabajo para el estudio del comportamiento endometrial *in vitro* (173).

Cultivo de la línea celular ECC-1

La línea celular ECC-1 se mantuvo en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 5% de SFB (PAA Laboratories) y piruvato de sodio 5,5 mg/ml (Sigma) (medio completo). Además se adicionaron los antibióticos estreptomina 100 μ g/ml y penicilina 100 UI/ml (Sigma). Las células se cultivaron en

frascos de 25 o 75 cm² (Orange) con una densidad inicial entre 6x10³ y 1x10⁴ células viables por cm², se incubaron en estufa a 37°C con 5% CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 70-80%, momento en el cual se subcultivaron o se utilizaron para los experimentos detallados más adelante.

Evaluación de la proliferación celular

Se sembraron 10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos (Axygen). Se incubaron por 48 hs a 37°C en estufa gaseada en medio completo, luego se cultivaron otras 24 hs en condiciones de hambreado (0% SFB) antes de ser estimuladas con celecoxib: 0, 50, 75 o 100 µM; rosiglitazona: 0, 0,01, 0,1, 1, 5, 20, 50 o 100 µM; o una combinación de ambas drogas. La proliferación celular se evaluó luego de 24 y 48 hs de estímulo con los compuestos. Para evaluar la proliferación celular se utilizó el kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Brevemente esta técnica se basa en la reducción metabólica del MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenol)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para producir un compuesto soluble en el medio de cultivo de color amarillo (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células. Este método es muy utilizado para evaluar supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido. Dos horas antes de finalizar con el tiempo de estimulación se agregaron 20 µl por pocillo de MTS, se esperó a que reaccionara el color y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de placas a 492 nm (Labsystem Multiscan). Los resultados se expresaron como porcentaje del basal, media ± SEM.

Evaluación de la apoptosis

Se sembraron 2x10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos (Axygen). Se incubaron 48 hs a 37°C en estufa gaseada en medio completo, luego se cultivaron otras 24 hs en condiciones de hambreado antes de ser estimuladas con celecoxib 100 µM, rosiglitazona 100 µM o una combinación de ambas drogas, por duplicado.

La apoptosis se evaluó luego de 24 y 48 horas de estímulo con los compuestos. Al cabo de estos tiempos las células se levantaron con 0,05% tripsina-EDTA (Gibco), se frenó la reacción con medio de cultivo suplementado con 10% SFB y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 130 xg. Además, se recolectaron y centrifugaron los sobrenadantes para incluir en el análisis aquellas células que luego del tratamiento se despegaron de la placa. Ambos sedimentos se juntaron, por

tratamiento, y las células se fijaron en 2% paraformaldehído (Sigma) en PBS y se guardaron a 4°C hasta su evaluación.

Se utilizó la técnica de marcación del extremo libre del ADN con nucleótidos acoplados a fluoresceína por medio de la enzima transferasa de nucleótidos (TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling, TUNEL) para evaluar los niveles de apoptosis. Se utilizó el kit de detección de la apoptosis *In Situ* Cell Death detection kit (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS para quitar el fijador y se permeabilizaron durante 2 minutos con una solución 0,1% Tritón X-100 (Anedra) - 0,1% Citrato de sodio (Sigma) en hielo. Luego de lavar nuevamente 2 veces con PBS se procedió a la incubación de las células con la enzima TdT y los nucleótidos acoplados a fluoresceína durante 1 hora a 37°C. Al finalizar la hora de incubación, las células se lavaron con PBS 2 veces y se resuspendieron en PBS fresco para realizar el pasaje de las mismas por el citómetro de flujo (BD FACSAria, BD Biosciences). Se analizaron 10000 eventos en cada caso. Los datos obtenidos por el programa del equipo se analizaron posteriormente con el programa Cyflogic, el cual también se utilizó para realizar los histogramas presentados. Se realizaron los controles de autofluorescencia de las drogas utilizadas; el control negativo consistió en células tratadas con la combinación de las drogas incubadas en ausencia de la enzima TdT; el control positivo utilizado fueron células Jurkat estimuladas durante 24 horas con 1 μ M de estaurosporina (Sigma).

Evaluación de la expresión proteica de proteínas apoptóticas por Western blot

Se sembraron 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Axygen). Se incubaron 48 hs a 37°C en estufa gaseada en medio completo, luego se cultivaron otras 24 hs en condiciones de hambreado antes de ser estimuladas con celecoxib 100 μ M, rosiglitazona 100 μ M o una combinación de ambas drogas durante 48 hs adicionales. Las células se levantaron raspándolas con un rastrillo a 4°C en buffer lisis (Tris HCl 50 mmol pH 7,5, EDTA 1 mmol, EGTA 1 mmol, NaCl 150 mmol, glicerol 10%, NP40 1% MgCl₂ 1 mmol, SDS 0,1%) con 1:500 de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) y se guardaron a -70°C.

Al momento de realizar la cuantificación de proteínas, se descongelaron las muestras, se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 16000 xg, se separó el sobrenadante y se descartó el sedimento. Se cuantificó la concentración de proteínas presentes en el sobrenadante mediante la técnica de Bradford (171).

Se estudió la expresión de Bax, Bcl-2 y Fas. Se utilizó la expresión de las proteínas β tubulina o tubulina como control de carga. Fas, receptor de FasL, es una molécula crucial en la inducción de la apoptosis por la vía de los receptores de muerte o extrínseca.

De cada muestra se tomó una alícuota conteniendo 20 µg de proteínas y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% durante aproximadamente 90 minutos a 150 V constantes. Se transfirieron las bandas proteicas resultantes a una membrana de nitrocelulosa de 2 µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences). Los productos proteicos se identificaron con los anticuerpos primarios detallados en la tabla 1 mediante procedimientos estándar de Western blot. Se trató la membrana con una solución de leche descremada 5% en TBST 0,1% para bloquear el pegado inespecífico y se incubó con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. El bloqueo de la membrana para el posterior revelado de tubulina se hizo con una solución de leche descremada 5% en PBS Tween 0,1% (PBST 0,1%).

Luego de la incubación se realizaron seis lavados por 5 minutos cada uno con TBST 0,1% o PBST 0,1% según correspondiera. Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la tabla 2, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en TBST 0,1% o PBST 0,1%. Se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno en TBST 0,1% (o PBST 0,1%) y un lavado de 5 minutos en TBS (o PBS). La visualización de las bandas se realizó por quimioluminiscencia, utilizando el kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Inc) en el sistema G-Box (Syngene); capturándose las imágenes con el software GeneSnap (Syngene). La cuantificación se realizó mediante el análisis densitométrico de las bandas, utilizando el software ImageJ, normalizadas con la expresión de tubulina o βactina en cada calle, según correspondiera. Los datos se expresaron como porcentaje del basal, media ± SEM.

Anicuerpo primario (especie)	Dilución utilizada	Marca
Bax (conejo)	1:100 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
Bcl-2 (ratón)	1:200 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
Fas (conejo)	1:200 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
βactina (ratón)	1:1000 (1% leche TBST 0,1%)	Abcam
Tubulina (conejo)	1:10000 (PBST 0,1%)	Sigma

Tabla 1 Anticuerpos primarios utilizados para la detección proteica por la técnica de Western blot.

Anticuerpo secundario	Dilución utilizada	Marca
Anti IgG de conejo	1:1000 (TBST 0,1% o PBST 0,1%)	Sigma
Anti IgG de ratón	1:2000 (TBST 0,1%)	R&D

Tabla 2 Anticuerpos secundarios utilizados para la detección proteica por la técnica de Western blot. Los anticuerpos secundarios utilizados están acoplados a peroxidasa para su posterior revelado por quimioluminiscencia.

Cálculos estadísticos

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante test no paramétrico de Kruskal Wallis seguido del test de múltiples comparaciones de Dunn. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Se consideró estadísticamente significativo solamente aquellos valores cuyo p fuera \leq 0,05.

Experimentos *in vivo*

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 2 meses de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas, teniendo acceso a agua y alimento *ad libitum* en el bioterio del IBYME. Todos los procedimientos se hicieron bajo las Normas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH) de los Estados Unidos y fueron aprobados por el Comité de Ética del IBYME.

A todos los animales se les realizó la cirugía de inducción de endometriosis que se describe a continuación.

Cirugía para la inducción de la endometriosis

A todos los animales se les indujeron lesiones endometriósicas mediante el trasplante de uno de los cuernos uterinos al mesenterio del intestino como se ha descrito previamente (102). Brevemente, los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal con 100 mg/kg de ketamina (Holliday) y 10 mg/kg de xilacina (Richmond) y se les realizó una incisión medioventral para exponer el útero y los intestinos. Se ligó el cuerno uterino derecho en ambos extremos y se lo retiró, colocándolo en medio estéril DMEM-F12 (Gibco). Se abrió el cuerno uterino longitudinalmente y se lo cortó en fragmentos de aproximadamente 4 mm². A continuación, tres fragmentos de cuerno uterino se suturaron al mesenterio del intestino con un solo punto de sutura con hilo de nylon 6-0

(Supralon, Ethicon) y se cerró el abdomen. Este modelo animal ha sido aceptado como modelo experimental para el estudio de la endometriosis en numerosos trabajos publicados (102,176-178).

Diseño Experimental

Tratamiento con celecoxib y anastrozole

Los ratones se dividieron en cuatro grupos experimentales: Control (150 µl solución fisiológica vía intraperitoneal), Celecoxib (1500 ppm de alimento, Pfizer), Anastrozole (10 mg/kg, vía intraperitoneal, AstraZeneca) Celecoxib + Anastrozole (tratamiento combinado). Todos los tratamientos se iniciaron en el día 1 post-cirugía y se continuaron durante 28 días.

La elección de la vía de administración de celecoxib se basó en lo reportado en la literatura en el momento de la realización del experimento. En primer lugar se lo administró con el alimento, ya que esto era lo que estaba reportado de manera sistemática en los trabajos publicados hasta el momento y la dosis de 1500 ppm era la más utilizada (179-185). El alimento con celecoxib se preparó en el laboratorio. El personal del bioterio proporcionó el alimento en polvo, al que se le agregó la cantidad necesaria de celecoxib para alcanzar los 1500 ppm, se agregó etanol 70° para formar una pasta espesa a la que se le pudiera dar la forma y consistencia características del alimento comercial. Se secó en estufa a 37°C.

Diariamente se pesó el alimento que se colocó en la jaula y al día siguiente se volvió a pesar para calcular la cantidad de alimento consumido por ratón. Luego, el alimento era repuesto por alimento fresco.

Para la segunda tanda de experimentos, en los que celecoxib se administró conjuntamente con rosiglitazona, se calculó la dosis de celecoxib ingerida por ratón en los experimentos iniciales y se administró la misma, por sonda esofágica.

Tratamiento con celecoxib y rosiglitazona

Los ratones se dividieron en cuatro grupos experimentales: Control (100 µl de agua estéril con 0,5% de carboximetilcelulosa [CMC]), Celecoxib (Pfizer, 200 mg/kg reconstituido en agua estéril 0,5% CMC), Rosiglitazona (Montpellier, 0,16 mg/kg reconstituida en agua estéril), Celecoxib + Rosiglitazona (tratamiento combinado). Todos los tratamientos se administraron por vía oral (sonda esofágica) diariamente durante 28 días iniciándose en el día 1 post-cirugía.

Todos los animales fueron monitoreados diariamente a lo largo de los experimentos. No se encontraron evidencias de toxicidad a las dosis administradas basándonos en el peso corporal, el consumo de comida, el comportamiento y los niveles de actividad de los animales tratados comparados con los controles.

Evaluación del tejido ectópico

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical luego de las 4 semanas de tratamiento. Se abrió la cavidad abdominal, se contó el número de lesiones desarrolladas, se midieron los diámetros mayor y menor de cada lesión con un calibre y se determinaron los radios mayor (R) y menor (r). El tamaño de la lesión se calculó utilizando la siguiente fórmula $V=(4/3)\pi.r^2.R$ (186). Luego las lesiones fueron extraídas y fijadas en formaldehído al 10%. El tejido ectópico fijado se embebió en parafina, se cortó en secciones de 5 μm de espesor y se tiñó con hematoxilina y eosina. Los cortes fueron examinados para confirmar la presencia de endometriosis.

Evaluación de la proliferación celular, expresión de COX-2, expresión de caspasa-3 clivada y densidad vascular en el tejido ectópico

La proliferación celular, la expresión de caspasa-3 clivada y la densidad vascular se evaluaron por inmunohistoquímica en cortes de tejido ectópico empleando un anticuerpo policlonal anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) de ratón obtenido en conejo (Santa Cruz Biotechnology), un anticuerpo anti-COX-2 obtenido en conejo (Santa Cruz Biotechnology), un anticuerpo anti-caspasa-3 clivada obtenido en conejo (Cell Signalling) y dos anticuerpos monoclonales anti-CD31 y anti-CD34 de ratón obtenidos en rata (Abcam).

El antígeno PCNA es una proteína nuclear de 36 kDa que está asociado con la ADN polimerasa delta que es responsable de iniciar la duplicación del ADN. Al igual que el Ki-67, el anti-PCNA reconoce células que se encuentran en las diferentes fases de división del ciclo celular, sin asociarse a las células quiescentes (187).

La molécula de adhesión celular CD31 reacciona frente al antígeno JC-70, que es una glicoproteína de membrana que se expresa en algunas células hematopoyéticas y endoteliales, identificando vasos largos y pequeños.

El antígeno CD34 es una glicoproteína transmembranal presente en células progenitoras humanas: los precursores eritroides, mieloides y megacariocíticos son CD34 positivos. El CD34 está presente en células endoteliales de vasos pequeños (excepto placenta y bazo).

La inmunodetección de CD31 y CD34 como marcadores vasculares es ampliamente utilizada en distintos modelos experimentales (188,189).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de conejo y anti-IgG de rata obtenidos en cabra (ambos de Sigma-Aldrich) biotinilados. Posteriormente se trataron las preparaciones con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Dako). A continuación se realizó el revelado con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Dako) y la tinción de contraste nuclear con hematoxilina de Harris (Biopack). La especificidad de la reacción se comprobó por incubación de las secciones con suero no inmune como sustituto del anticuerpo primario y se realizó el control de isotipo. Los porta objetos fueron evaluados al microscopio óptico a 400X de magnificación.

Las células positivas para PCNA se identificaron con un microscopio óptico de campo claro por la presencia de un precipitado nuclear marrón. La cuantificación de la proliferación celular se realizó contando un mínimo de 300 células epiteliales elegidas al azar y se calculó el porcentaje de células en proliferación sobre el total. Luego los porcentajes se utilizaron para obtener la media de cada grupo experimental.

Para el cálculo del área vascularizada, se tomaron 10 fotografías por corte y las mismas se analizaron con el programa ImageJ para calcular el área vascularizada sobre el área total. El porcentaje de área positiva para CD31 o CD34 se determinó por campo y se promedió por animal. Todos los porcentajes fueron utilizados para calcular la media del grupo experimental.

Evaluación de la apoptosis en el tejido ectópico

Para la cuantificación de la apoptosis, los cortes de tejido ectópico se sometieron a la técnica de marcación del extremo libre con nucleótidos acoplados a digoxigenina por medio de la enzima transferasa de nucleótidos (TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling, TUNEL). Se utilizó el kit de detección de apoptosis Apoptag Plus (Chemicon International) que se fundamenta en la localización y marcación de los extremos 3'-OH que se generan por la fragmentación del ADN en las células apoptóticas (190). Los cortes se trataron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones se desparafinaron con xileno, se rehidrataron con etanol en concentraciones decrecientes y se permeabilizaron con 20 µg/ml de Proteínasa K (Gibco). La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno 3%, luego se incubó una hora a temperatura ambiente con la enzima TdT y nucleótidos marcados con digoxigenina. A continuación se incubó con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa, seguido del sustrato de la peroxidasa, DAB. La tinción de contraste se realizó con hematoxilina. Los controles positivos fueron suministrados por el fabricante del kit. Los controles negativos se obtuvieron sometiendo cortes de tejido a tratamiento idéntico a las muestras a evaluar pero sin el agregado de la enzima TdT.

Los porta objetos fueron evaluados al microscopio óptico a 400X de magnificación, se evaluaron 300 células epiteliales elegidas al azar como mínimo y se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas sobre el total.

Evaluación de los niveles de los metabolitos de PGE (PGEM) en el líquido peritoneal

Luego de 4 semanas de tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Luego de abrir el abdomen, se colectó el líquido peritoneal por lavado de la cavidad peritoneal con 1 ml de solución salina. Se centrifugó durante 10 minutos a 210 xg a 4°C y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su posterior evaluación. Los niveles de PGEM en el líquido peritoneal fueron evaluados por la técnica de ELISA con el kit comercial PGE metabolite EIA (Cayman) de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante. Brevemente, al momento de realizar el ensayo, se descongelaron las muestras, se procedió a la derivatización de los metabolitos así como del estándar provisto en el kit, obteniéndose un producto estable con el que se puede trabajar a temperatura ambiente. Se incubaron las muestras y la curva estándar durante 18 hs a temperatura ambiente en una placa recubierta con un anticuerpo anti-IgG de ratón al cual se le había pegado un antisuero específico de PGEM. Al incubar las muestras, la PGEM libre o la PGEM unida a acetilcolinesterasa (provista por el fabricante como marcador), se acoplaron al antisuero. Al cabo de las 18 hs, se hicieron 5 lavados y se agregó el reactivo de revelado. Luego de otros 60 minutos de incubación se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro de placas (Labsystems Multiscan). Cada medición se hizo por duplicado. La precisión interensayo es de un promedio de 12,3%. Los resultados se expresaron en pg/ml como la media de la concentración \pm SEM.

Análisis estadístico

De acuerdo a la distribución de los datos a comparar, el análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de múltiples comparaciones de Dunn o mediante el test de ANOVA de una vía seguido del test de múltiples comparaciones de Bonferroni. Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Se consideraron estadísticamente significativos solamente aquellos valores cuyo $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación fueron parcialmente publicados en los siguientes trabajos:

Meresman G and **Olivares C**. Involvement of prostaglandins in the pathophysiology of endometriosis. **Endometriosis**, InTech, En prensa, 2012. ISBN: 979-953-307-888-4

Olivares C, Ricci A, Bilotas M; Barañao RI; Meresman GF. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. **Fertility and Sterility**, 96(2):428-33, 2011.

Meresman GF, Bilotas M, **Olivares C**, Ricci A, Bastón JI, Barañao RI. Caracterización del endometrio y del ambiente peritoneal de mujeres que padecen endometriosis. Estudios in vivo e in vitro de nuevas alternativas terapéuticas para esta enfermedad. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (ABCL)** 45(4):635-638, 2011.

Meresman GF, Bilotas M, **Olivares C**, Ricci A, Bastón JI, Barañao RI. Evaluación de nuevas posibles terapias para la endometriosis. **Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva (SAEGRE)** Volumen XVIII (1): 5-16 2011.

Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesone M, Meresman GF. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. **Human Reproduction**, 23(12):2701-8, 2008

Meresman GF, **Olivares C**, Bilotas M, Buquet R, Sueldo C. Efecto del inhibidor selectivo de COX-2 celecoxib sobre el crecimiento del tejido endometrial eutópico en endometriosis. Bases experimentales que sustentan la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la endometriosis. **Reproducción** 21(3): 55-67, 2006, Buenos Aires, Argentina.

Además, parte del trabajo fue incluido en el siguiente premio:

Premio "*Alberto Peralta Ramos*" al mejor trabajo en Ginecología. Evaluación de nuevas alternativas terapéuticas para la endometriosis. Meresman GF, Bilotas M, **Olivares C**, Ricci A, Bastón JI y Barañao RI. **Academia Nacional de Medicina**, Buenos Aires, Diciembre de 2011.

Efectos del inhibidor de ciclooxigenasa-2 sobre la regulación del crecimiento de células epiteliales endometriales

Celecoxib inhibe la proliferación celular en células epiteliales endometriales (CEE) de pacientes con endometriosis y mujeres controles

Cuando comenzamos con el estudio de la acción de celecoxib, lo primero que estudiamos fue su efecto sobre la proliferación de CEE. Se evaluó la síntesis de ADN mediante la incorporación de ³H-timidina. Se realizaron cultivos de CEE a partir de biopsias provenientes de mujeres del grupo control y de pacientes con endometriosis, cada uno de los cuales fue tratado con distintas concentraciones del inhibidor de COX-2 (10, 20, 25, 40, 50, 75, y 100 μ M).

Los resultados obtenidos muestran que celecoxib a concentraciones bajas (10-40 μ M) no posee efecto estadísticamente significativo sobre la síntesis de ADN basal. Por otro lado, concentraciones de 50, 75 y 100 μ M de celecoxib inhibieron significativamente la proliferación celular. Este patrón de inhibición de la proliferación celular se observó tanto en cultivos de pacientes con endometriosis como de controles (Figura 8).

Celecoxib induce la apoptosis en CEE de pacientes con endometriosis y mujeres controles

A continuación, se evaluó la capacidad de celecoxib de inducir apoptosis en los cultivos de CEE. Para ello se realizaron cultivos de células provenientes de biopsias de pacientes con endometriosis y de mujeres controles. Todos ellos fueron tratados con distintas concentraciones de celecoxib (10, 20, 25, 40, 50, 75, y 100 μ M). La apoptosis se evaluó mediante la técnica naranja de acridina-bromuro de etidio.

Complementariamente a los datos obtenidos en los ensayos de proliferación celular, se observó que las dosis mayores o iguales a 50 μ M de celecoxib incrementaron de manera significativa los niveles de apoptosis en cultivos tanto de pacientes con endometriosis como de mujeres controles respecto a los niveles basales sin estimular (Figura 9). Las concentraciones más bajas evaluadas (10-40 μ M) no produjeron un aumento significativo de la apoptosis en comparación a las células sin estimular (Figura 9).

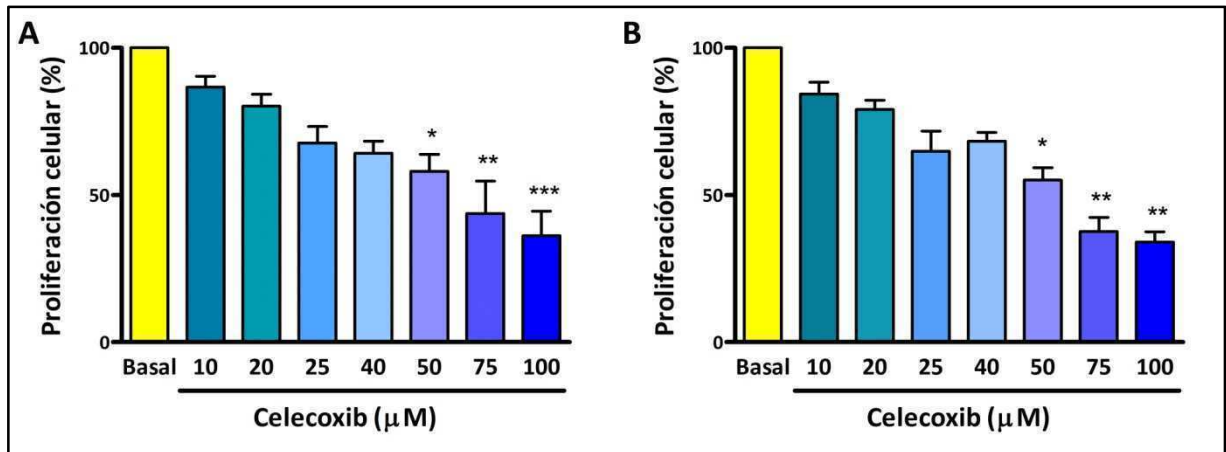


Figura 8 Efecto de celecoxib sobre la proliferación de células epiteliales endometriales en cultivo

Se evaluó proliferación celular por Incorporación de ^3H -timidina en CEE provenientes de biopsias de endometrio de (A) mujeres controles y (B) pacientes con endometriosis. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (sin celecoxib), media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs basal. $n = 5$.

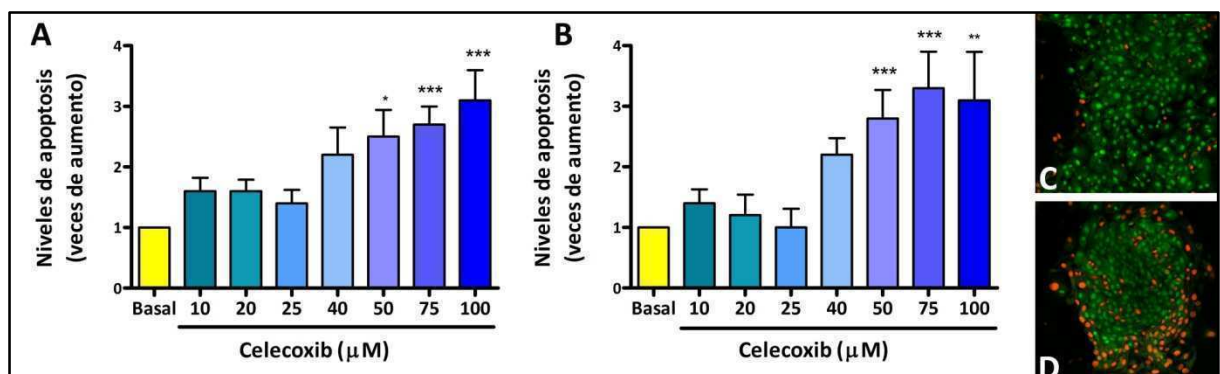


Figura 9 Efecto de celecoxib sobre la apoptosis de células epiteliales endometriales en cultivo

Se evaluó apoptosis por el método naranja de acridina-bromuro de etidio en células epiteliales provenientes de biopsias de endometrio de (A) mujeres controles y (B) pacientes con endometriosis. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (sin celecoxib), media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 8$. (C y D) Micrografías representativas de un cultivo de CEE proveniente de una paciente con endometriosis donde se muestran la (C) apoptosis basal y (D) apoptosis inducida con 50 μM de celecoxib.

A partir de estos resultados iniciales, nos interesamos en continuar profundizando los efectos que posee el inhibidor de COX-2 sobre el crecimiento de las CEE.

Dado que tanto en este trabajo como en otros realizados con anterioridad en nuestro laboratorio no se hallaron diferencias significativas en los resultados de los distintos parámetros

evaluados entre los cultivos provenientes del grupo control y de endometriosis (167,191), los experimentos continuaron con muestras provenientes de pacientes con endometriosis.

Los efectos de celecoxib sobre la proliferación celular serían independientes de la actividad de COX-2

El siguiente paso entonces, fue evaluar si los efectos que se observaron sobre la proliferación celular endometrial eran directamente provocados por la inhibición de la actividad de COX-2. Se eligió la concentración de celecoxib más baja con la que se habían hallado efectos inhibitorios sobre la proliferación celular, la de 50 μM , y se agregó PGE₂, el principal producto de la actividad de la enzima, en distintas concentraciones (200-2000 pg/ml). Los resultados se muestran en la Figura 10. Hemos observado que incluso con la concentración más alta de PGE₂ evaluada (2000 pg/ml), no logró revertirse el efecto de celecoxib sobre la proliferación celular. Esto estaría indicando que la presencia del producto de la actividad de la enzima no es suficiente para lograr restablecer los niveles de proliferación celular.

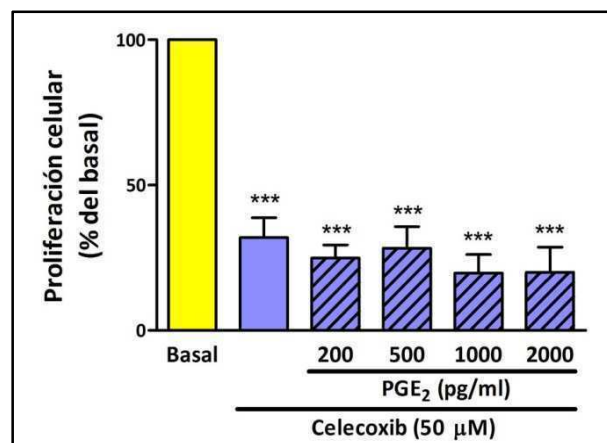


Figura 10 Efecto de la adición de PGE₂ exógena sobre la proliferación de células epiteliales endometriales tratadas con celecoxib

Se evaluó la proliferación de CEE provenientes de biopsias de pacientes con endometriosis en cultivo estimuladas con celecoxib y PGE₂ por el método de incorporación de ³H-timidina a la síntesis de ADN. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (sin celecoxib), media \pm SEM. ***p<0,001 vs. Basal. n = 9.

El inhibidor de COX-2 no modificaría la expresión de Bax y Bcl-2

Bax y Bcl-2 son proteínas pro y antiapoptóticas respectivamente y forman parte de la vía intrínseca de regulación de la muerte celular programada. Se estudió si estas proteínas participaban de la inducción de la apoptosis que se había obtenido previamente con el agregado de celecoxib. Se evaluaron los niveles de expresión de Bax y Bcl-2 en los cultivos de CEE provenientes de pacientes

con endometriosis tratados con celecoxib a distintas concentraciones (25, 50 y 100 μM) mediante Western blot. Es importante estudiar estas proteínas en conjunto para evaluar la relación de expresión entre ellas. El aumento o disminución de la expresión de cada una de ellas en forma independiente, no aporta la información completa para un adecuado análisis.

Los resultados demostraron que luego de 24 horas de estímulo con las concentraciones de celecoxib evaluadas, no se produjeron cambios ni en la expresión de cada una de las proteínas estudiadas, ni en la relación de sus niveles de expresión. Siendo así, podríamos sugerir que la vía intrínseca no estaría involucrada en la inducción de la apoptosis estimulada por este inhibidor de COX-2 o que al menos, estas proteínas no estarían participando de esa cascada de señalización intracelular. Los datos se muestran en la Figura 11.

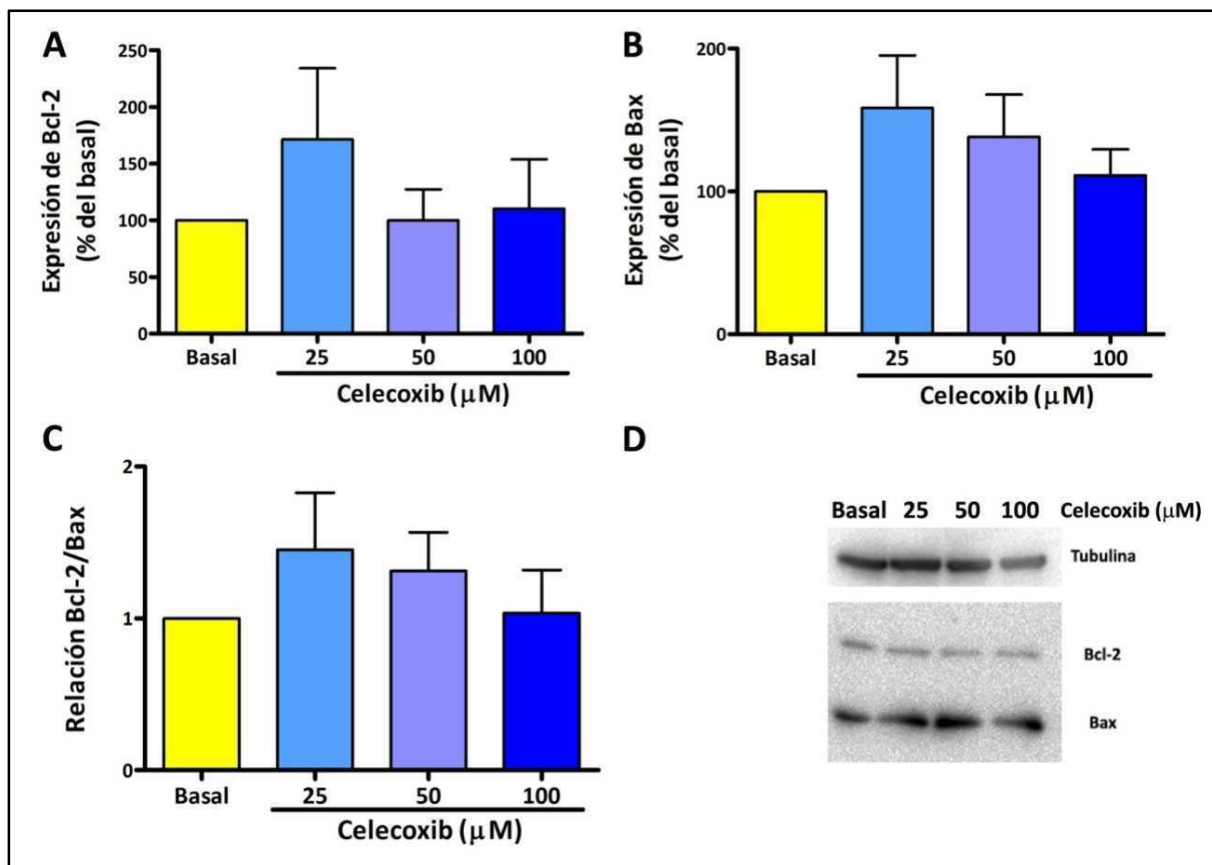


Figura 11 Efectos de celecoxib sobre la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis

Se realizaron homogenatos de CEE provenientes de pacientes con endometriosis estimulados con celecoxib 25, 50 y 100 μM . Se evaluó la expresión de la proteína (A) antiapoptótica Bcl-2 y la proteína (B) proapoptótica Bax por Western blot. (C) Se calculó la relación de expresión entre ambas proteínas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (sin estimular), media \pm SEM. $p > 0,05$ vs. Basal. $n = 5$. (D) Fotografía representativa de la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 en cultivos de CEE tratados con celecoxib. La expresión de tubulina se utilizó como control de carga.

El inhibidor de COX-2 disminuye la síntesis de VEGF

El VEGF es un factor proangiogénico que está involucrado en la patogénesis de la endometriosis. Está ampliamente reportado en la bibliografía que las mujeres con endometriosis poseen niveles elevados de VEGF en el líquido peritoneal (120). Tanto los macrófagos peritoneales como la lesión endometriósica producen VEGF y constituyen las fuentes más importantes de este factor liberado en el ambiente peritoneal.

Siendo así, a continuación quisimos evaluar si las células de tejido eutópico de pacientes con endometriosis poseen la capacidad de sintetizar y liberar VEGF *in vitro* y si, el agregado del inhibidor de COX-2, afecta este parámetro.

Se realizaron cultivos de CEE de biopsias de pacientes con endometriosis y se estimularon con celecoxib en las dosis de 25, 50 y 100 μM . Luego de 24 horas de cultivo se recolectó el medio condicionado en el cual se midió la concentración de VEGF por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Hemos observado que las CEE de pacientes con endometriosis tienen la capacidad de sintetizar y secretar VEGF, pero al ser tratadas con celecoxib esta síntesis disminuye de manera significativa respecto a los niveles basales.

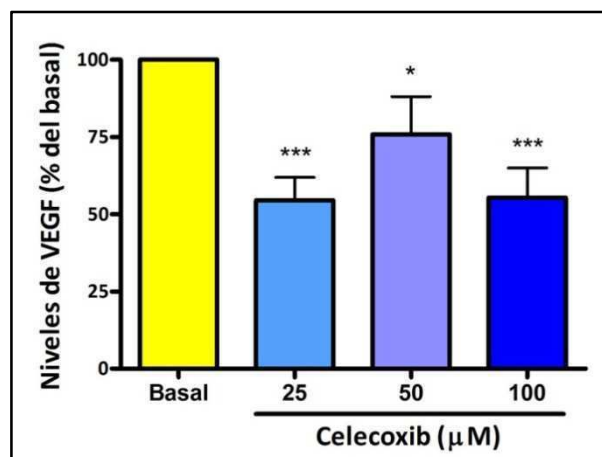


Figura 12 Efecto de celecoxib sobre la síntesis de VEGF por parte de células epiteliales endometriales. Se midió la concentración de VEGF en los sobrenadantes de cultivos de CEE provenientes de pacientes con endometriosis estimuladas con celecoxib, por el método de ELISA. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Basal sin estimular. $n = 13$

Efectos del tratamiento con los inhibidores de ciclooxigenasa-2 y aromatasa, celecoxib y anastrozole respectivamente, sobre el establecimiento y desarrollo de lesiones endometriósicas en ratón

Celecoxib inhibe el establecimiento y crecimiento de las lesiones endometriósicas en ratón

A partir de los resultados obtenidos *in vitro*, quisimos complementar los estudios y evaluar el efecto de celecoxib sobre el desarrollo de la endometriosis experimental en ratón.

Por otro lado, resultados previos obtenidos en el laboratorio demostraron un efecto beneficioso de los inhibidores de aromatasa sobre el crecimiento endometrial en cultivo y sobre el desarrollo de la endometriosis *in vivo* (101,102). Además, numerosos trabajos reportaron un efecto significativo de la combinación de inhibidores de aromatasa con inhibidores de COX-2 sobre la inhibición del crecimiento tumoral (192). En base a estos datos, quisimos estudiar la acción de esa combinación en nuestro modelo experimental de endometriosis en ratón.

Luego de cuatro semanas de tratamiento con el inhibidor de COX-2 y el inhibidor de aromatasa, de manera separada o conjunta, los animales se sacrificaron y se evaluó el grado de desarrollo de la enfermedad. El primer examen que se realizó, fue el análisis macroscópico de la cavidad peritoneal. Se localizaron y contaron las lesiones endometriósicas desarrolladas e, *in situ*, se las midió con un calibre en dos ejes perpendiculares para determinar su tamaño. Los resultados de estas observaciones se muestran en la Figura 13.

El tratamiento con celecoxib administrado de manera individual disminuyó de manera significativa el número de lesiones desarrolladas por ratón comparado con el grupo Control ($p < 0,05$) y, además, logró disminuir el crecimiento de las mismas. El tamaño promedio alcanzado por las lesiones establecidas fue significativamente menor en el grupo de ratones que recibió celecoxib ($p < 0,01$ vs. Control).

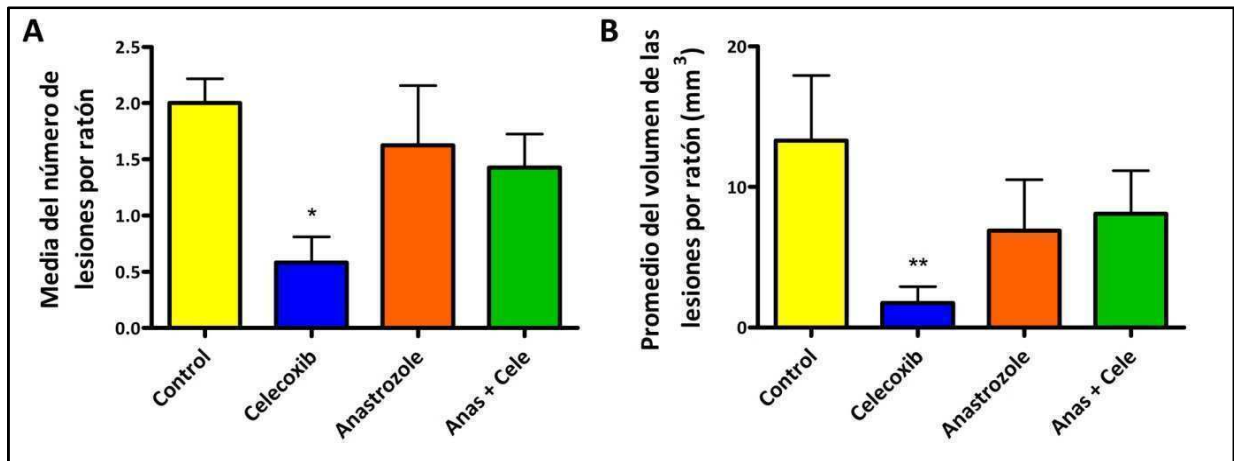


Figura 13 Efecto de celecoxib y anastrozole sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas. Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, anastrozole o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y el número de lesiones establecidas se contó y midió. (A) Celecoxib inhibe de manera significativa el número de lesiones establecidas por ratón. (B) Celecoxib provoca una disminución significativa del tamaño de las lesiones. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. grupo Control. $n = 9$ (Control), $n = 12$ (Celecoxib), $n = 8$ (Anastrozole), $n = 7$ (Anas + Cele).

El desarrollo de las lesiones endometriósicas se ve afectado por el tratamiento con el inhibidor de COX-2 y el inhibidor de aromatasa

Una vez que las lesiones se contaron y midieron, se extrajeron y fijaron para poder evaluar cortes histológicos de las mismas. Sobre los cortes se realizó inmunohistoquímica, en primer lugar, para cuantificar las células que presentaban una activa proliferación celular. Para esto se utilizó como marcador el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Como puede verse en la Figura 14, los tratamientos con celecoxib y anastrozole por separado lograron disminuir de manera significativa la proliferación celular en las lesiones endometriósicas en comparación con el grupo control ($p < 0,05$ para los grupos Celecoxib y Anastrozole por separado). Sin embargo, si bien se observa una tendencia hacia la disminución, no hemos podido demostrar una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación celular en las lesiones endometriósicas provocada por el tratamiento combinado.

Además, se estudió y cuantificó el número de células en apoptosis en las lesiones endometriósicas por la técnica de TUNEL. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos. Complementariamente a los resultados de proliferación celular observados, el tratamiento con el inhibidor de COX-2 así como el tratamiento con el inhibidor de aromatasa administrados por separado, aumentaron de manera significativa el número de células en apoptosis dentro de la lesión endometriósica comparado con las lesiones provenientes de los ratones controles ($p < 0,05$ para los grupos Celecoxib y Anastrozole). Por otro lado, no observamos cambios en los niveles de apoptosis luego de la administración del tratamiento combinado.

Se evaluó y cuantificó, también, la densidad vascular en las lesiones endometriósicas a través del marcador endotelial CD34. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos. Solamente el tratamiento con celecoxib de manera individual provocó una disminución del área positiva para este marcador, lo que se traduce en una menor vascularización en las lesiones endometriósicas provenientes de ratones tratados con el inhibidor de COX-2 ($p < 0,05$ vs. grupo Control).

Celecoxib estimularía y anastrozole inhibiría la expresión de COX-2

Se evaluó de manera cualitativa la expresión de la enzima COX-2 en las lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón luego del tratamiento con el inhibidor de su actividad y el inhibidor de aromatasa.

Se observó expresión de COX-2 en las lesiones endometriósicas luego de todos los tratamientos aplicados. En todos los casos la expresión de COX-2 fue más alta en las células epiteliales que en las estromales (Figura 15).

Si bien no se realizó una evaluación cuantitativa, los resultados de las observaciones fueron claros en mostrar una disminución de la expresión de COX-2 en las lesiones endometriósicas provenientes de ratones tratados únicamente con anastrozole. Por otro lado, con el tratamiento combinado los niveles de expresión de la enzima resultaron semejantes al de los ratones controles, mientras que en los ratones tratados con celecoxib, la expresión de COX-2 fue más intensa que en los controles. Estos datos concuerdan con trabajos previos donde observamos que la expresión de COX-2 es estimulada por celecoxib en cultivos de CEE de pacientes con endometriosis (193). Además, resultados similares habían sido previamente reportados por otros autores en otros sistemas celulares (126,194).

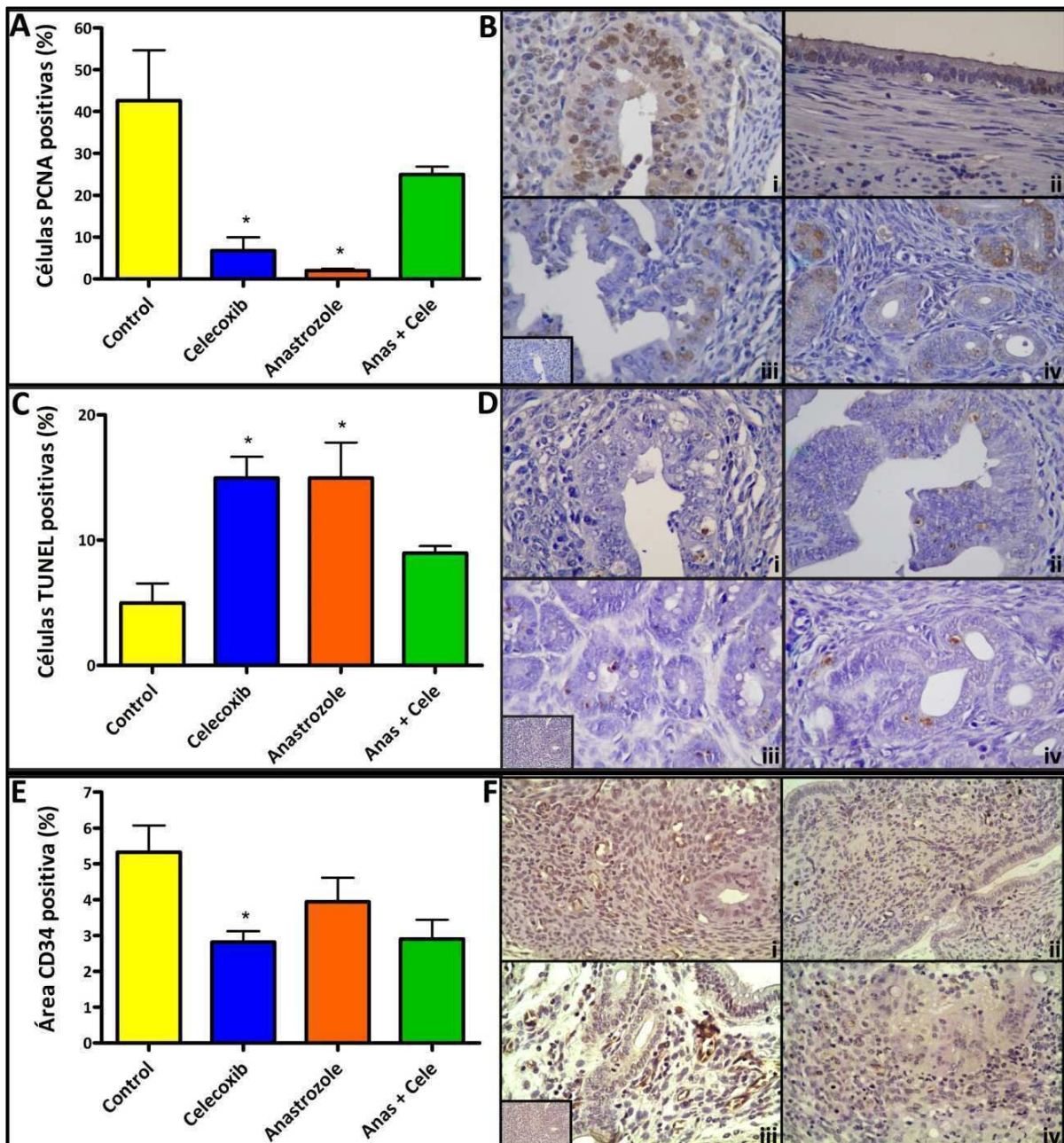


Figura 14 Efecto de celecoxib y anastrozole sobre la proliferación y muerte celular de células epiteliales y sobre la densidad vascular en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, anastrozole o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron. (A y B) La proliferación celular se evaluó mediante inmunohistoquímica de PCNA, (C y D) la apoptosis se evaluó mediante la técnica de TUNEL y (E y F) la densidad vascular a través del marcador endotelial CD34. (A y C) Celecoxib y anastrozole administrados de manera independiente inhibieron de manera significativa la proliferación celular en las lesiones de ratón y aumentaron los niveles de apoptosis. (E) Celecoxib de manera individual disminuyó el área positiva para el marcador endotelial CD34. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo Control. (B, D y F) Micrografías representativas de la inmunomarcación de PCNA, TUNEL y CD34. Grupo Control (i), grupo Celecoxib (ii), grupo Anastrozole (iii), grupo Anas + Cele (iv). Recuadro: control negativo, (B y F) los cortes se incubaron con suero no inmune o (D) los cortes se incubaron en ausencia de la enzima TdT. Magnificación x400. n = 5.

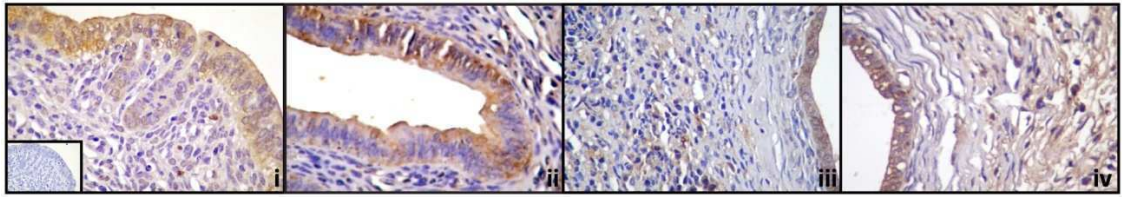


Figura 15 Evaluación de la expresión de COX-2 en las lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, anastrozole o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron. Los niveles de expresión de la enzima COX-2 se evaluaron por inmunohistoquímica. La expresión de la enzima es similar en las lesiones del grupo con el tratamiento combinado y el control, estaría aumentada en el grupo tratado con celecoxib y disminuiría luego del tratamiento con anastrozole. Micrografías representativas de la inmunomarcación de COX-2. Grupo Control (i), grupo Celecoxib (ii), grupo Anastrozole (iii), grupo Anas + Cele (iv). Recuadro: control negativo, suero no inmune. Magnificación x400. n = 5.

Efectos del tratamiento con el inhibidor de ciclooxigenasa-2, celecoxib, y el agonista de PPAR γ , rosiglitazona, sobre el crecimiento de una línea celular epitelial endometrial

Celecoxib y rosiglitazona inhiben la proliferación de la línea celular ECC-1

Luego de haber obtenido los resultados previamente presentados en cultivos primarios, quisimos corroborarlos utilizando como modelo experimental la línea celular ECC-1. Además, nos interesaba la estrategia de poder estudiar la implicancia de otra molécula, PPAR γ , en el crecimiento de las células. Para ello continuamos utilizando como inhibidor selectivo de COX-2 a celecoxib e incorporamos a nuestros ensayos a rosiglitazona, un agonista de PPAR γ con importantes antecedentes en la inhibición del crecimiento tumoral (195).

En primer lugar, estudiamos el efecto tanto de celecoxib como de rosiglitazona sobre la proliferación celular de ECC-1. Estimulamos de manera independiente los cultivos con distintas concentraciones de las drogas y observamos los efectos luego de 24 y 48 horas de estímulo. Los resultados que obtuvimos y sus respectivas significancias estadísticas se muestran en la Figura 16 A-D. Allí puede verse claramente que las tres concentraciones de celecoxib testeadas así como las concentraciones mayores o iguales a 20 μ M de rosiglitazona provocaron una disminución estadísticamente significativa de la proliferación celular. No observamos diferencias entre los cultivos que estimulamos 24 o 48 horas ya que en ambos casos se halló el mismo patrón de inhibición de la proliferación celular.

El siguiente paso entonces, fue combinar aquellas concentraciones de celecoxib y rosiglitazona que habían afectado la proliferación celular de manera independiente, y estudiar si el efecto se potenciaba. Los datos que obtuvimos indicaron que la combinación de estas drogas mejora significativamente el resultado anterior respecto a la concentración más alta de celecoxib. Sin embargo, los niveles de proliferación celular luego de la administración de los compuestos combinados, no se modifican con respecto a los resultados obtenidos luego del estímulo individual con rosiglitazona. Como en el caso anterior, los resultados a 24 y a 48 horas mostraron el mismo patrón. Los datos y las significancias estadísticas se exponen en la Figura 16 E y F.

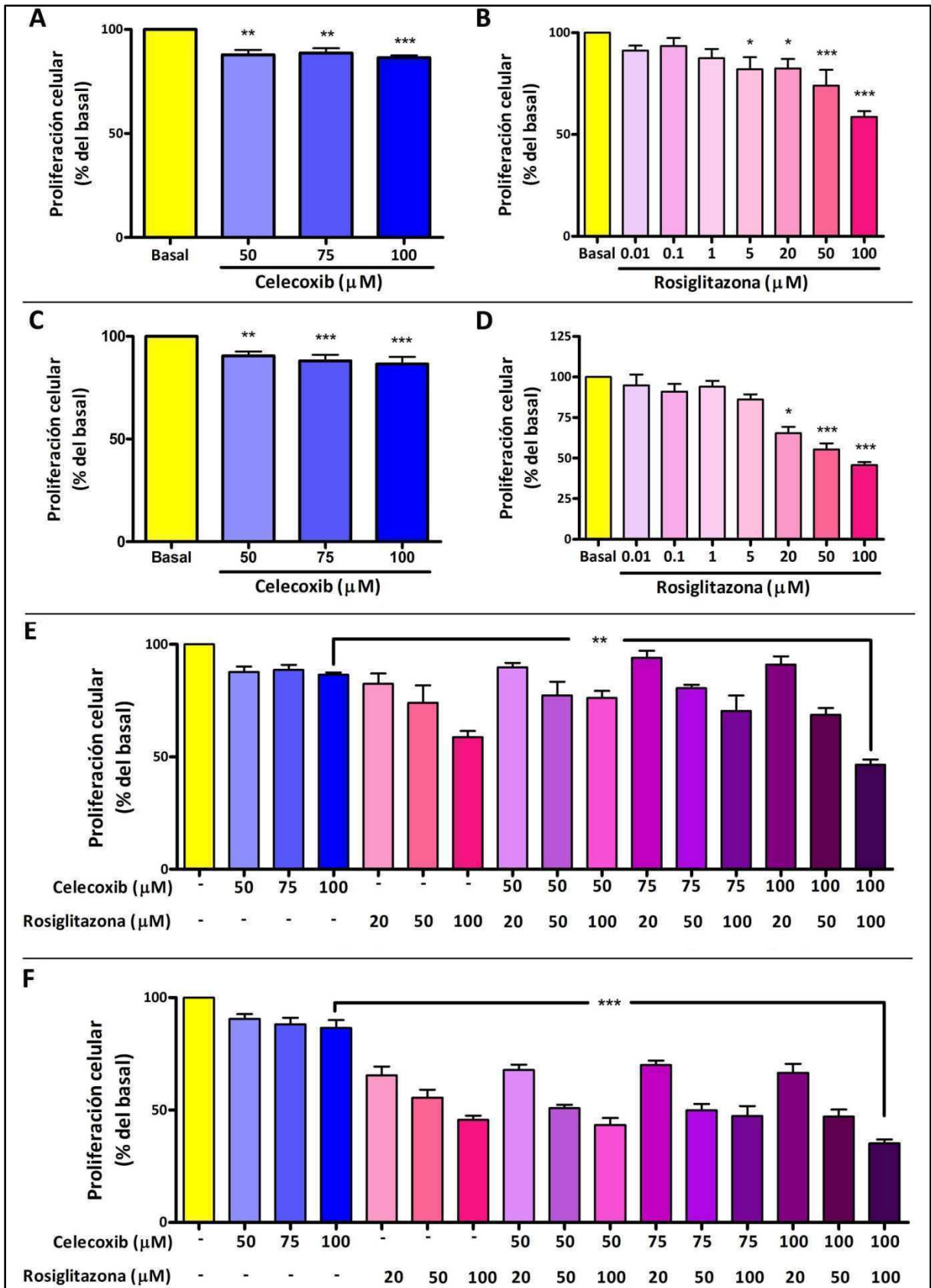


Figura 16 Efectos de celecoxib y rosiglitazona sobre la proliferación de la línea celular ECC-1

Se evaluó la proliferación celular por la técnica de reducción del MTS en las células ECC-1 estimuladas con (A y C) celecoxib, (B y D) rosiglitazona y (E y F) su combinación. (A, B y E) células estimuladas durante 24 hs. (C, D y F) células estimuladas durante 48 hs. Los resultados se expresan como porcentaje del basal, media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. basal sin estimular. n = 8.

El inhibidor de COX-2 y el agonista de PPAR γ no afectarían la apoptosis de la línea celular ECC-1

Nos propusimos evaluar si los efectos que causan celecoxib y rosiglitazona sobre la proliferación celular se complementaban con posibles efectos sobre la apoptosis en las células ECC-1. Para ello estimulamos las células con las dosis más altas de cada uno de los compuestos por separado y en combinación. Por un lado, estudiamos la apoptosis a través de la técnica de TUNEL y al mismo tiempo realizamos Western blots para evaluar modificaciones en la expresión de distintas proteínas involucradas en este proceso.

En la Figura 17 se puede observar que los tratamientos, tanto por 24 como por 48 horas, no aumentaron los niveles de apoptosis respecto a la condición basal. En consistencia con este resultado, cuando evaluamos algunas de las proteínas involucradas en la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis, tampoco vimos modificaciones en su expresión. Estos últimos resultados se muestran en la Figura 18.

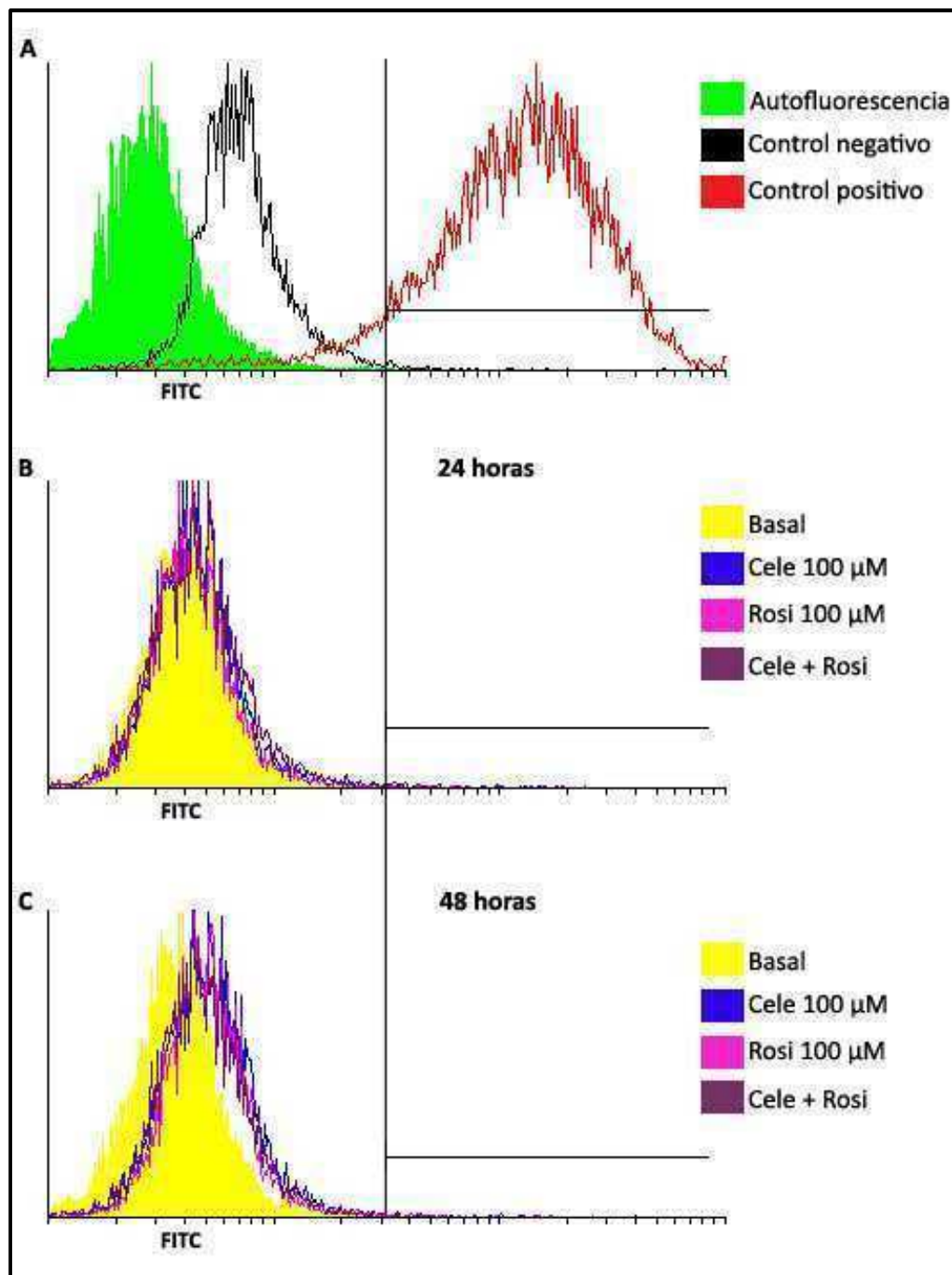


Figura 17 Efectos de celecoxib y rosiglitazona sobre la apoptosis de las células ECC-1

Las células ECC-1 fueron estimuladas durante (B) 24 o (C) 48 horas con celecoxib 100 μM , rosiglitazona 100 μM y su combinación (Cele + Rosi). Al cabo de este tiempo las células se levantaron y fijaron para luego realizar la técnica de TUNEL por citometría de flujo. No se observó un aumento de los niveles de apoptosis respecto a la condición basal sin estimular. El experimento se repitió 5 veces. (A) Control de autofluorescencia de la combinación de las drogas; control negativo: células ECC-1 estimuladas con la combinación de las drogas incubadas con nucleótidos marcados en ausencia de la enzima transferasa; control positivo: células Jurkat estimuladas con 1 μM de estaurosporina durante 24 horas.

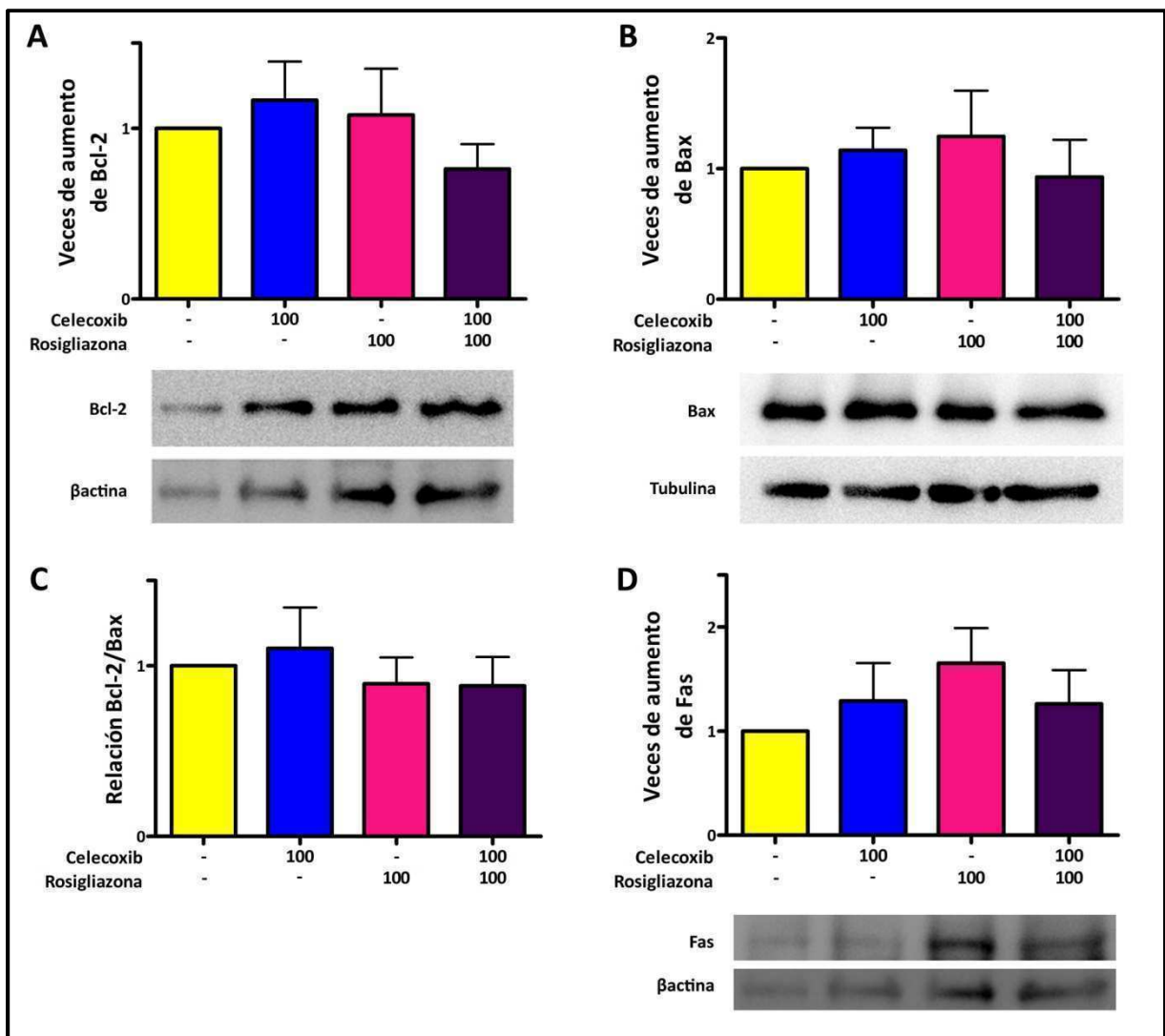


Figura 18 Efectos de celecoxib y rosiglitazona sobre la expresión de proteínas relacionadas con las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis

Las células ECC-1 fueron estimuladas durante 48 horas con celecoxib 100 μ M, rosiglitazona 100 μ M y su combinación. Por la técnica de Western blot se evaluó la expresión de la proteína (A) antiapoptótica Bcl-2, la proteína (B) proapoptótica Bax, ambas relacionadas con la vía intrínseca de la apoptosis; y de la proteína (D) Fas, relacionada con la vía extrínseca. Paneles inferiores (A, B, y D): fotografías representativas de la expresión de las proteínas evaluadas y su correspondiente control de carga, tubulina o β actina. (C) Se calculó la relación de expresión entre las proteínas Bcl-2 y Bax. En ninguno de los casos se observó una modificación en la expresión de las proteínas evaluadas respecto a la condición basal sin estimular, $p > 0,05$. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. $n = 7$.

Efectos del tratamiento con el inhibidor de ciclooxigenasa-2, celecoxib, y el agonista de PPAR γ , rosiglitazona, sobre el crecimiento de tejido endometrial en un sitio ectópico en un modelo de endometriosis en ratón

Celecoxib y su combinación con rosiglitazona inhiben el establecimiento y crecimiento de las lesiones endometriósicas en ratón

En base a los resultados obtenidos *in vitro*, decidimos evaluar estos compuestos en el modelo de endometriosis *in vivo*.

Luego de cuatro semanas de tratamiento con el inhibidor de COX-2 y con el agonista de PPAR γ , por separado o combinados, los animales se sacrificaron y se procedió a la evaluación macroscópica de la cavidad peritoneal. Se localizaron y contaron las lesiones desarrolladas y se las midió *in situ* con un calibre en dos ejes perpendiculares para determinar su tamaño. Los resultados se muestran en la Figura 19.

Tanto el tratamiento con celecoxib como el tratamiento conjunto lograron disminuir de manera significativa el número de lesiones desarrolladas comparándolos con el grupo control ($p < 0,05$ para Celecoxib y Cele+Rosi) (Figura 19A). Al evaluar el tamaño de las lesiones desarrolladas observamos que todos los tratamientos fueron eficientes en disminuir de manera significativa el tamaño de las lesiones endometriósicas en relación al grupo que recibió el vehículo ($p < 0,05$ para los grupos Celecoxib y Rosiglitazona; $p < 0,001$ Cele+Rosi) (Figura 19B).

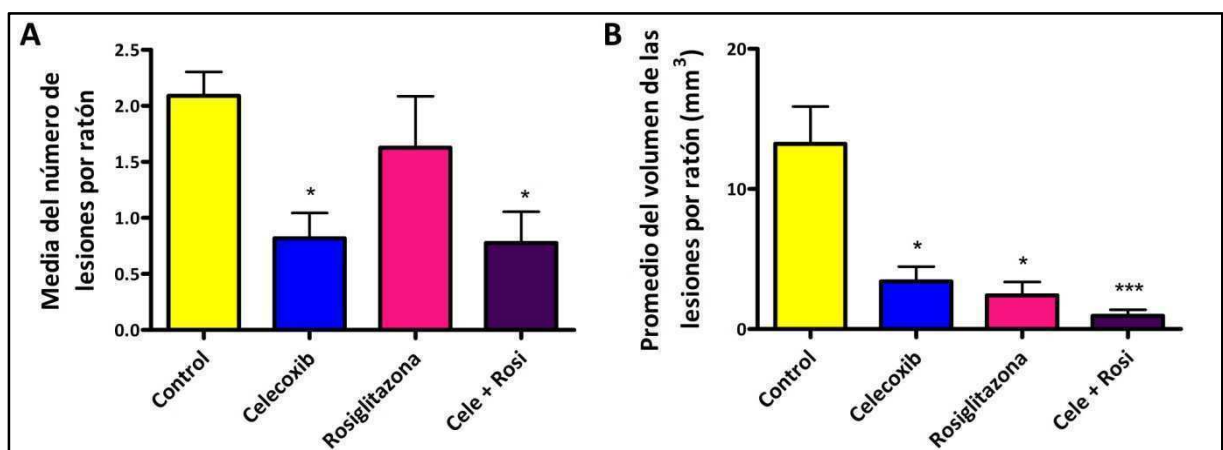


Figura 19 Efecto de celecoxib y rosiglitazona sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, rosiglitazona o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y el número de lesiones establecidas se contó y midió. (A) Celecoxib y el tratamiento combinado (Cele + Rosi) inhibieron de manera significativa el número de lesiones establecidas por ratón. (B) Celecoxib, rosiglitazona y el tratamiento combinado (Cele + Rosi) disminuyeron de manera significativa el tamaño de las lesiones. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. grupo Control. $n = 11$ (Control), $n = 12$ (Celecoxib), $n = 8$ (Rosiglitazona), $n = 10$ (Cele + Rosi).

La administración de celecoxib disminuye la actividad de COX-2

Como primer paso, luego de los buenos resultados obtenidos de la evaluación macroscópica del desarrollo de la endometriosis *in vivo*, quisimos evaluar en ese mismo modelo, la acción de celecoxib y rosiglitazona sobre la inhibición de la actividad de la enzima COX-2. Para ello, al momento del sacrificio de los ratones se procedió a la recolección del líquido peritoneal, donde se evaluó la concentración de metabolitos de PGE, como indicador de la actividad de la enzima que lo produce, COX-2.

El resultado obtenido se muestra en la Figura 20. El tratamiento con el inhibidor de COX-2 mostró tener un efecto sobre la disminución de la síntesis de PGE₂, lo que se dedujo luego de observar una disminución significativa del contenido de metabolitos de este prostanoides en el líquido peritoneal, en comparación con el grupo de ratones que recibieron el vehículo ($p < 0,05$ Celecoxib). Los tratamientos de las drogas combinadas y la administración de rosiglitazona en forma individual, no provocaron cambios estadísticamente significativos en la síntesis de PGE₂ ($p > 0,05$ Rosi y Cele+Rosi vs. Control).

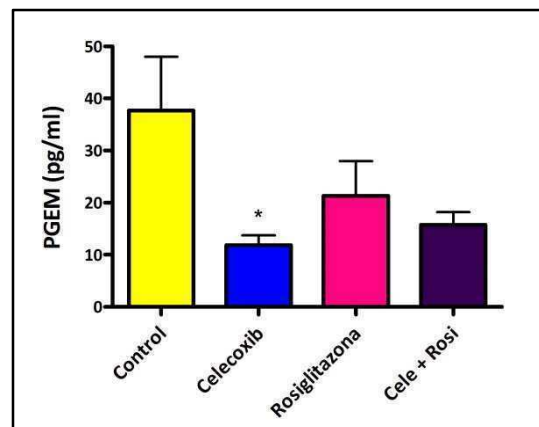


Figura 20 Efecto de celecoxib y rosiglitazona sobre el contenido de metabolitos de PGE en el líquido peritoneal de ratón

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, rosiglitazona o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y se recolectó el líquido peritoneal. Se evaluó el contenido de metabolitos de PGE por ELISA. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo Control. $n = 9$ (Control y Celecoxib), $n = 8$ (Rosiglitazona), $n = 10$ (Cele + Rosi).

Celecoxib y rosiglitazona afectan el desarrollo de las lesiones endometriósicas en ratón a través de la inhibición de la proliferación celular, la inducción de la apoptosis y la disminución de la vascularización.

Quisimos entonces evaluar posibles mecanismos implicados en la inhibición del crecimiento endometrial por parte de celecoxib y rosiglitazona.

Una vez que las lesiones se contaron y midieron, se extrajeron y fijaron para poder evaluar cortes histológicos de las mismas. Sobre los cortes se realizó inmunohistoquímica de PCNA para cuantificar las células que presentaban una activa proliferación celular. En la Figura 21, se presenta el resultado de las células positivas para el marcador PCNA. Como puede observarse tanto los tratamientos por separado, como su combinación, inhibieron de manera significativa la proliferación celular en las lesiones endometriósicas respecto al grupo Control ($p < 0,01$ Celecoxib; $p < 0,001$ Rosiglitazona y Cele+Rosi).

Además, se estudió y cuantificó el número de células en apoptosis en las lesiones endometriósicas por la técnica de TUNEL. En la Figura 21 se muestra el resultado obtenido. Los tres tratamientos aumentaron de manera significativa el número de células apoptóticas en las lesiones endometriósicas en comparación con el grupo Control ($p < 0,05$ para todos los tratamientos evaluados). Estos resultados son complementarios y consistentes con los obtenidos para proliferación celular.

Por otro lado, en base al incremento de los niveles de apoptosis observados, esperábamos hallar también aumentada la expresión de caspasa-3 clivada. Sin embargo, al evaluar y cuantificar el número de células positivas para esta enzima en su forma activa, sorprendentemente no obtuvimos diferencias significativas respecto al control ($p > 0,05$ para todos los tratamientos). El resultado se presenta en la Figura 22.

Se estudió también la vascularización de las lesiones endometriósicas a través de los marcadores de células endoteliales CD31 y CD34 (Figura 23). Los resultados de la evaluación de CD31, arrojaron una disminución significativa de la inmunomarcación en las lesiones endometriósicas provenientes de animales tratados con rosiglitazona y con su combinación con celecoxib, comparado al grupo Control ($p < 0,05$ Rosiglitazona y Cele + Rosi). Cuando el marcador evaluado fue CD34, luego de todos los tratamientos aplicados se observó una disminución significativa del área positiva respecto al Control ($p < 0,05$ Celecoxib y Rosiglitazona; $p < 0,01$ Cele + Rosi).

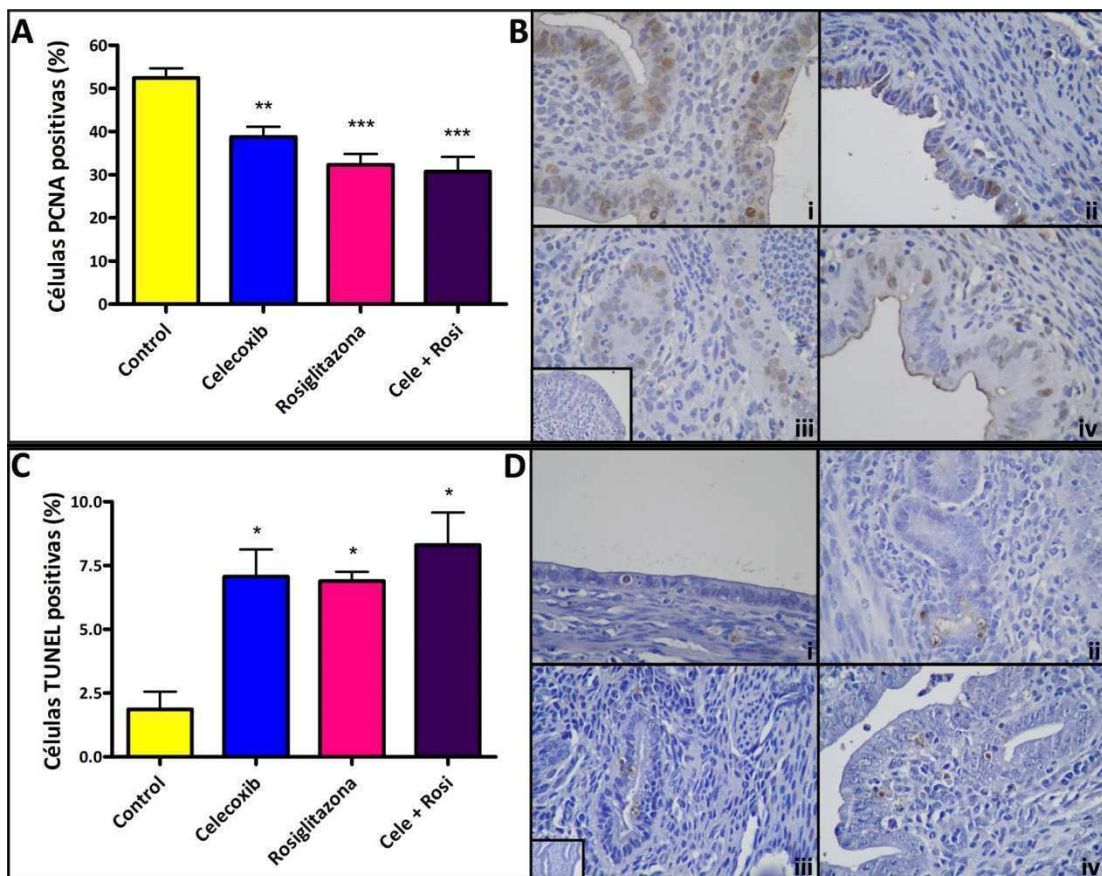


Figura 21 Efecto de celecoxib y rosiglitazona sobre la proliferación y muerte celular de células epiteliales en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, rosiglitazona o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron. (A y B) La proliferación celular se evaluó mediante inmunohistoquímica de PCNA, (C y D) la muerte celular se estudió mediante la técnica de TUNEL. (A y C) Celecoxib, rosiglitazona y el tratamiento combinado inhibieron de manera significativa la proliferación celular y aumentaron los niveles de apoptosis en las lesiones endometriósicas de ratón. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. grupo Control. (B y D) Micrografías representativas de la inmunomarcación con PCNA y TUNEL. Grupo Control (i), grupo Celecoxib (ii), grupo Rosiglitazona (iii), grupo Cele + Rosi (iv). Recuadro: control negativo, (B) suero no inmune, (D) los cortes se incubaron en ausencia de enzima TdT. Magnificación x400. n = 8 (Control), n = 7 (Celecoxib), n = 5 (Rosiglitazona), n = 5 (Cele + Rosi).

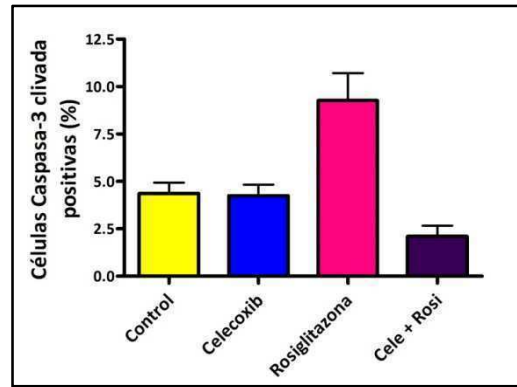


Figura 22 Expresión de caspasa-3 clivada en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, rosiglitazona o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron. Se evaluó la proteólisis y activación de caspasa-3 por inmunohistoquímica. Celecoxib, rosiglitazona y la administración conjunta de las drogas no aumentaron de manera significativa el número de células que expresan positividad para caspasa-3 clivada en las lesiones de ratón. Los resultados se expresan como media \pm SEM. $p > 0,05$ vs. grupo Control.

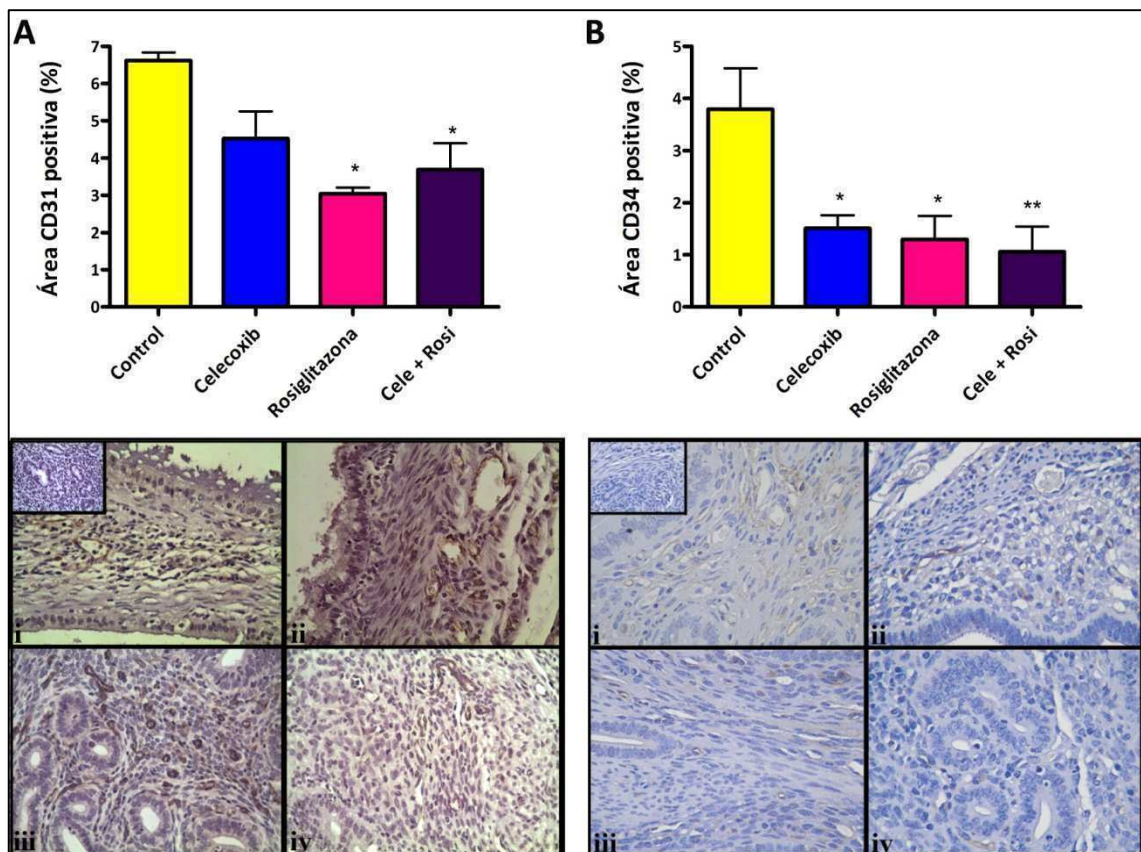


Figura 23 Densidad vascular en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Luego de 4 semanas de tratamiento con vehículo, celecoxib, rosiglitazona o ambas drogas simultáneamente los animales se sacrificaron y las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron. Se evaluó la inmunomarcación para CD31 y CD34 y se calculó el área vascularizada en las lesiones con el programa ImageJ. **Paneles superiores (A) CD31:** Rosiglitazona y la administración combinada de las drogas provocaron una disminución significativa del área positiva para CD31 en las lesiones endometriósicas de ratón respecto al grupo Control. **(B) CD34:** Celecoxib y rosiglitazona, por separado, así como su combinación, provocaron una disminución significativa del área de la lesión positiva para CD34 respecto al grupo Control. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. grupo Control. **Paneles inferiores:** Micrografías representativas de la inmunomarcación con **(A) CD31** y **(B) CD34**. Grupo Control (i), grupo Celecoxib (ii), grupo Rosiglitazona (iii), grupo Cele + Rosi (iv). *Recuadro:* control negativo, suero no inmune. Magnificación x400. n = 5.

DISCUSIÓN

La endometriosis es una patología que afecta a un alto porcentaje de la población femenina. Un millón de mujeres argentinas sufren de endometriosis y se estima que 200 millones de pacientes padecen esta patología en el mundo, constituyendo la tercera causa de internación ginecológica. Los tratamientos disponibles hasta el día de hoy no son enteramente eficaces, ya que si bien los síntomas de la enfermedad disminuyen mientras se los está administrando, ninguna de estas terapias reduce de manera real las recidivas a las que las pacientes están expuestas. Es importante también recordar, que la terapéutica que se les ofrece a las pacientes con endometriosis posee efectos secundarios adversos. Además, la imposibilidad del embarazo mientras se está bajo los efectos del tratamiento es un factor que limita su uso por períodos prolongados en mujeres deseosas de concebir.

Por estos motivos, es que la investigación en endometriosis se centra principalmente en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para minimizar los efectos colaterales, disminuir los casos de recidivas y para permitir que las mujeres puedan tener la posibilidad de intentar un embarazo aunque se encuentren bajo tratamiento médico. Avances en los conocimientos sobre la fisiopatología de la endometriosis han permitido que los investigadores piensen en nuevos medicamentos que actúen en forma más directa sobre los implantes en sí, que inhiban los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, y que potencialmente sean más eficaces en su acción de erradicar las lesiones endometriósicas (1,80).

Si bien la endometriosis no es una enfermedad neoplásica, se ha propuesto que comparte algunos mecanismos de establecimiento y desarrollo similares con el cáncer. Al igual que en el establecimiento de un tumor, el tejido endometrial que se desarrolla en un sitio ectópico debe irrigarse, proliferar y tener una complicidad con el sistema inmunológico para poder crecer. Siendo así, en el proceso de búsqueda de nuevos compuestos para tratar la endometriosis, muchas veces recurrimos a los datos arrojados por la investigación en cáncer y nos basamos en sus resultados para proponer nuevas drogas antimitóticas.

Para la realización de este trabajo nos basamos no sólo en los resultados positivos que se habían obtenido a lo largo de los últimos años en los distintos modelos de cáncer con la utilización de los compuestos que evaluamos, sino que también partimos de resultados previos de nuestro laboratorio que nos sirvieron de base para plantear los distintos objetivos.

Los cultivos de células epiteliales de endometrio eutópico fueron utilizados como modelo para estudiar el impacto del inhibidor de COX-2, celecoxib, sobre el crecimiento endometrial. Aunque las células utilizadas no eran directamente obtenidas de lesiones endometriósicas y su respuesta *in*

vitro puede no ser idéntica, el propósito de usar células endometriales en cultivo a corto plazo como modelo para las lesiones endometriósicas ha sido descrito previamente en la literatura y es aceptado que este sistema permite establecer un correcto paralelismo con las lesiones endometriósicas (101,196). Además, se utilizó la fracción epitelial ya que COX-2 se expresa preferentemente en este tipo celular por sobre la fracción estromal (112).

Este trabajo lo comenzamos estudiando los efectos del inhibidor de COX-2 sobre células en cultivo provenientes de pacientes con endometriosis y de mujeres sin la enfermedad. Obtuvimos resultados alentadores al descubrir que celecoxib, el inhibidor selectivo de COX-2 que elegimos para nuestra investigación, no sólo lograba inhibir la proliferación celular sino que aumentaba los niveles de apoptosis tanto para el caso de las células endometriales de pacientes, como de mujeres sin endometriosis. Cabe aclarar que no sólo en este trabajo, sino en los anteriores publicados en nuestro laboratorio (167,191), no hemos observado diferencias en la respuesta de los cultivos de células provenientes de pacientes o de mujeres controles.

Si bien, al momento de comenzar con esta investigación, estos resultados eran inéditos en endometriosis, nuestros datos coincidían con los reportados por otros autores que utilizaron inhibidores de COX-2 y lograron inhibir el crecimiento tumoral (126,197-199).

Los inhibidores específicos de COX-2 han mostrado poseer la habilidad de inhibir el crecimiento celular e inducir apoptosis y arresto del ciclo celular en distintos modelos *in vivo* y en líneas celulares tumorales (127,197,200). El tratamiento de distintas líneas celulares tumorales con celecoxib induce el arresto del ciclo celular en fase G1, lo que está acompañado de una disminución en la expresión de las ciclinas A, B y D, un aumento en la expresión de inhibidores del ciclo celular y una pérdida en la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (201,202). Asimismo se ha propuesto que celecoxib estaría inhibiendo el ciclo celular a través de la inhibición de la proteína quinasa B o por la enzima río arriba de ésta, la quinasa dependiente de fosfoinositol 1 (203,204). Es posible que el mecanismo de la inhibición de la proliferación celular observada en los cultivos de células epiteliales endometriales utilizados en este trabajo sea semejante a los observados en los modelos descritos más arriba, sin embargo, son necesarios estudios complementarios para dilucidar los procesos moleculares implicados.

La importancia de estos resultados en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar la endometriosis es promisorio dado que se ha observado que COX-2 se sobreexpresa en las lesiones endometriósicas (112). La sobreexpresión de COX-2 induce la proliferación celular e inhibe la apoptosis (205). Siendo así, es posible especular que celecoxib resultaría eficiente en el control del crecimiento endometriósico. Sin embargo, la inhibición de la actividad de COX-2 no sería la única vía

posible de acción de celecoxib en la disminución del crecimiento celular ya que algunos trabajos advierten que esta droga podría actuar por una vía independiente de la expresión de COX-2 (127,205,206).

A continuación, nos propusimos también evaluar si la inhibición de la actividad de COX-2 es suficiente para inhibir la proliferación celular. Para ello adicionamos el producto de la actividad de la enzima, PGE₂, a los cultivos estimulados con celecoxib y estudiamos si los efectos sobre la proliferación de las células epiteliales endometriales era revertido. Utilizamos la dosis de 50 µM de celecoxib que era la mínima dosis a la que habíamos obtenido una inhibición significativa de la proliferación y agregamos concentraciones crecientes de PGE₂, ninguna de las cuales logró restablecer los niveles de proliferación celular obtenidos en el basal. De esta manera, logramos deducir que la inhibición de la actividad de COX-2 sería necesaria pero no suficiente para la inhibición de la proliferación celular y que celecoxib estaría actuando a otro nivel también, de manera independiente de COX-2, para inhibir la proliferación celular en nuestros cultivos.

En coincidencia con nuestros resultados, en un estudio realizado en células de colangiocarcinoma se observó que el efecto antiproliferativo de celecoxib era independiente de su capacidad para inhibir COX-2, ya que la concentración de celecoxib requerida para inducir el arresto del ciclo celular fue mayor que la necesaria para inhibir la actividad de COX-2 y, al igual que en nuestro caso, el agregado de PGE₂ al cultivo tampoco revirtió la inhibición de la proliferación celular (207).

Con respecto al aumento de apoptosis observado, los resultados obtenidos en nuestro modelo *in vitro* acuerdan con datos de diversos autores quienes observaron que celecoxib induce apoptosis en células humanas de cáncer de mama y en la línea celular Jurkat de linfocitos T (126,208). Este efecto también se reportó en células estromales endometrióticas (209).

Los mecanismos implicados en la inducción de apoptosis han sido atribuidos principalmente a la activación de la vía intrínseca. Luego del tratamiento con celecoxib en distintas líneas celulares de cáncer se observó una disminución en la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 y survivina (208), un aumento en la expresión de la proteína proapoptótica Bad (210) y una rápida liberación del citocromo c de la mitocondria y activación de Apaf-1 y de las caspasas 3, 8 y 9 (208,210), lo que coincide con una activación de la vía intrínseca de apoptosis.

Además, algunos trabajos han reportado la activación de la vía extrínseca de apoptosis: luego del tratamiento con celecoxib en carcinoma no microcítico de pulmón humano se observó un aumento en la expresión del receptor de muerte DR5 (211). Asimismo en células de carcinoma cervical se halló activación de la vía FAS-FADD (212).

Dadas las controversias que hay al respecto, decidimos estudiar si en nuestro modelo, estaba implicada la vía intrínseca en la activación de la apoptosis observada. Estudiamos entonces a Bax, proteína proapoptótica, y Bcl-2 su contraparte antiapoptótica. Sin embargo, no obtuvimos diferencias en la expresión de estas dos proteínas luego de la estimulación de las células epiteliales endometriales con celecoxib. Lamentablemente, por limitaciones en la disponibilidad de muestras de pacientes, no pudimos continuar con el estudio de otras proteínas implicadas en la apoptosis en los cultivos primarios. Siendo así, no podemos descartar la implicancia de la vía extrínseca o de otras proteínas de la vía intrínseca en la inducción de la apoptosis por parte de celecoxib.

Algunos estudios han demostrado que celecoxib inhibe el crecimiento tumoral induciendo la apoptosis por mecanismos independientes de la inhibición de COX-2 (205,206,208). Más aún, se ha reportado que celecoxib induce la apoptosis e inhibe la progresión tumoral en células deficientes de COX-2 tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (213,214). La concentración de celecoxib utilizada para inducir apoptosis en células tumorales en la mayor parte de los estudios realizados coincide con la hallada en nuestro trabajo, varía entre 40 y 100 μM y es superior a la necesaria para inhibir la actividad de COX-2 (126,205,213).

La dosis que logra inducir apoptosis en nuestros cultivos (entre 50 y 100 μM) parecería ser clínicamente relevante ya que se ha hallado que la concentración de los inhibidores de COX-2 en el suero de los pacientes tratados con los regímenes habituales de celecoxib varía entre 20 y 100 μM (126,215). Sin embargo, otros autores discrepan con este dato ya que sugieren que la concentración plasmática de celecoxib en pacientes tratados con una dosis diaria de 400 mg es de aproximadamente 3 μM y entonces, las concentraciones utilizadas para inducir apoptosis *in vitro* serían de 5 a 20 veces mayores (201,205). Estos investigadores explican esta discrepancia aduciendo que el tiempo requerido para observar la regresión de un tumor en pacientes es de varias semanas mientras que *in vitro* los efectos antiproliferativos se observan luego de pocas horas de tratamiento (216). Esta hipótesis se sustenta por los trabajos de Patel y col. quienes reportaron que celecoxib a bajas concentraciones (2,5-10 μM) posee efectos antiproliferativos en dos líneas celulares de cáncer de próstata cuando el tratamiento *in vitro* se extiende por más tiempo (217).

Por otra parte, un estudio realizado en pacientes reveló que la dosis de celecoxib necesaria para inhibir el crecimiento de los pólipos en personas que sufren de poliposis adenomatosa familiar (PAF) es de 800 mg/diarios y es mayor que la sugerida para obtener efectos antiinflamatorios que es de 100-200 mg dos veces al día. Este dato, nuevamente sugiere que las concentraciones de celecoxib requeridas para obtener efectos antiproliferativos son más elevadas (213).

La angiogénesis es un proceso fundamental implicado en la vascularización y por lo tanto en el desarrollo de la lesión endometriósica (33,49). Se han hallado altos niveles de VEGF, principalmente producido por las células endometriósicas y por los macrófagos peritoneales, en el fluido peritoneal de pacientes con endometriosis (113,114,218). Se ha propuesto al VEGF como uno de los factores responsables del establecimiento de la lesión y de la angiogénesis patológica en endometriosis. Siendo así, la importancia de hallar una droga que además de inhibir el crecimiento endometrial reduzca los niveles de este factor angiogénico es primordial.

La sobreexpresión de COX-2 en células tumorales induce la angiogénesis ya que el aumento de eicosanoides aumenta la expresión de VEGF y estimula la migración y proliferación de células endoteliales (219,220). Inhibiendo la actividad de COX-2, se eliminaría también la producción de prostaglandinas, lo que llevaría a una menor producción de VEGF y, por consiguiente, a una inhibición de la angiogénesis así como de la progresión de la endometriosis (118). En consecuencia nos propusimos investigar el efecto de celecoxib sobre la producción de VEGF en células endometriales provenientes de pacientes con endometriosis.

En nuestro estudio hemos observado que celecoxib indujo una disminución significativa de la producción de VEGF por parte de las células epiteliales endometriales, hecho que se relacionaría con la inhibición de la angiogénesis. Estos datos son coincidentes con trabajos previos que reportaron que celecoxib inhibe la angiogénesis e induce la apoptosis de células endoteliales tanto *in vivo* como *in vitro* (118,179). Acordando con nuestros resultados se ha observado también que este compuesto disminuye los niveles de VEGF en distintos sistemas celulares (118,126,198).

Continuando con la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos implicados en la inhibición de los mecanismos etiopatogénicos de la endometriosis, incluimos a un nuevo actor: PPAR γ . Esta molécula está siendo estudiada por su importancia en los mecanismos implicados en el desarrollo del cáncer y en la endometriosis, y constituye un nuevo blanco terapéutico al que se le está prestando atención dada la disponibilidad de drogas en el mercado que agonizan su actividad. Además, existen reportes que indican que la estimulación de los receptores PPAR γ junto con la inhibición de la actividad de COX-2 tienen efectos benéficos adicionales en algunos modelos de cáncer (157,158,221).

Los PPARs se expresan en una gran variedad de tejidos incluyendo tejidos reproductivos (139). La atención se ha centrado sobre PPAR γ en cáncer de mama porque se ha visto que se encuentra inactivo (156) y que, luego del tratamiento y activación de estos receptores con TZDs, se generaban claros efectos antitumorales (222). *In vivo*, en distintos modelos de cáncer en roedores, también se describieron efectos beneficiosos luego del tratamiento con TZDs, entre ellos: inhibición

del crecimiento tumoral, aumento de la apoptosis dentro del tumor y mayor supervivencia de los animales tratados (145,146,159).

En endometriosis, los ligandos de PPAR γ fueron utilizados con resultados promisorios tanto *in vitro* como *in vivo* (152,153,155,223,224). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos avocamos en primera medida a evaluar el efecto de celecoxib y rosiglitazona, un agonista de PPAR γ , sobre la proliferación de una línea celular endometrial: ECC-1.

Nuestro primer paso fue estudiar el efecto que tenían cada una de estas drogas sobre la proliferación celular de ECC-1, obteniendo efectos inhibitorios significativos luego del tratamiento de las células tanto con celecoxib como con rosiglitazona, respecto al estado basal. La inhibición de la proliferación celular por parte de celecoxib sobre las células ECC-1 no alcanzó los niveles de inhibición que habíamos obtenido previamente al hacer este ensayo en cultivos primarios. Este efecto puede deberse a que las células ECC-1 provienen de un adenocarcinoma y su capacidad proliferativa basal es muy alta en comparación a los cultivos primarios de células epiteliales endometriales, debiendo incubarlas en condiciones de hambreado, para lograr un efecto inhibitorio.

A continuación combinamos celecoxib y rosiglitazona en las dosis que habían tenido efecto sobre la proliferación de manera aislada y las adicionamos al cultivo de ECC-1. El resultado que obtuvimos fue que esta combinación mejora significativamente la inhibición de la proliferación celular respecto a la administración de celecoxib de manera individual. Sin embargo, si bien la combinación de celecoxib con rosiglitazona alcanzó para inhibir la proliferación celular de ECC-1, no mejoró los resultados inhibitorios obtenidos luego de la incubación de las células sólo con rosiglitazona. Si bien estos datos son inéditos en células endometriales, en un trabajo publicado recientemente, se reportó que la combinación de rosiglitazona con otro inhibidor selectivo de COX-2, NS-398, posee efectos sinérgicos sobre la disminución de la proliferación celular y el aumento de apoptosis en una línea celular de carcinoma pancreático (160).

A continuación, nos inclinamos por evaluar si esa inhibición de la proliferación celular se debía por lo menos en parte, a que las células estaban atravesando por un proceso de muerte celular por apoptosis. Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron que celecoxib y rosiglitazona en las dosis más altas evaluadas no inducen la muerte celular por apoptosis en la línea celular ECC-1 en los tiempos y condiciones empleados.

En coincidencia con estos resultados, se ha descrito la capacidad de rosiglitazona de inhibir la proliferación celular de manera diferencial sobre dos líneas celulares de neuroblastoma (225). Cellai y colaboradores han evaluado el efecto de esta TZD sobre el crecimiento de las líneas celulares SK-N-AS y SH-SY5Y y han observado que si bien rosiglitazona inhibió la proliferación celular en ambas

líneas celulares sólo estimuló los niveles de apoptosis en una de ellas, sin causar efectos sobre la otra (225). Al respecto, estos autores proponen que el estado de transactivación del receptor PPAR γ al ser agonizado por el ligando en cada tipo celular es clave en la respuesta que puede provocar (225).

En otro estudio en el que se evaluaron distintos agonistas de PPAR γ , se confirmó que rosiglitazona es la TZD que inhibe de manera más eficiente la proliferación celular de distintas líneas celulares de melanoma (226). Sin embargo, no se han observado efectos a la hora de evaluar la capacidad de troglitazona de inducir apoptosis mientras que sí se pudo demostrar que este agonista provoca un arresto de las células en G1 (226).

De manera similar, al evaluar celecoxib sobre líneas celulares de diversos orígenes, se observaron efectos variables sobre la proliferación celular y la apoptosis (227). Sin embargo, como se señaló anteriormente, celecoxib y los agonistas de PPAR γ han sido reiteradamente utilizados en distintos modelos obteniéndose, por lo general, resultados favorables sobre la inhibición de la proliferación celular y sobre la inducción de la apoptosis. Nosotros también demostramos estimulación de apoptosis por parte de celecoxib en cultivos primarios e inducción de muerte celular programada por parte tanto de celecoxib como de rosiglitazona en las lesiones provenientes de los ratones tratados a los que se les indujo endometriosis.

Los estudios que se realizaron dejan en evidencia que la acción de ambos compuestos es diferencial dependiendo del tipo celular en estudio. En consecuencia no es extraño comprobar que las dosis y tiempos que se requieren para provocar la muerte celular en una línea tumoral inmortalizada no son comparables con las necesarias para observar efectos en un cultivo primario o en un modelo *in vivo*.

En el caso de los resultados obtenidos en particular en nuestro trabajo, es probable que tengamos que ajustar los tiempos de estímulo o incluso las dosis con las que trabajamos. También puede estar ocurriendo que el estado de fosforilación del receptor en las células ECC-1 evite que la respuesta no sea tan exacerbada o que las células estén arrestadas. Cualquiera de estas hipótesis habría que corroborarla con estudios futuros, ya que con los datos que contamos hasta el momento no podemos descartar ninguna de ellas, así como tampoco inclinarnos a pensar que alguna sea más factible que otra. El hecho de que no hayamos observado efectos sobre la apoptosis, no invalida el hecho de que estas drogas posean claros efectos antiproliferativos como sí pudimos demostrar, ni tampoco desautoriza a los datos que demuestran que se producen estos efectos en otras líneas y otros modelos; incluso en este mismo trabajo.

Habiendo obtenido resultados sumamente interesantes utilizando celecoxib *in vitro* y contando, además, con resultados previos de nuestro laboratorio que daban cuenta de la eficacia de anastrozole sobre la inhibición del crecimiento de células endometriales tanto *in vitro* como *in vivo* (101,102), decidimos evaluar la combinación de estas drogas en el modelo animal de endometriosis. Además, la combinación de AINEs con inhibidores de aromatasa, había sido reportada previamente con éxito en distintos modelos de cáncer (129,228).

El modelo de endometriosis en ratón con el que contamos en el laboratorio está amplia y extensamente aceptado para el estudio de esta enfermedad (102,176,177). En esta parte del trabajo, nos interesamos en estudiar las implicancias de la inhibición de dos enzimas claves en el crecimiento de las lesiones endometriósicas como son aromatasa y COX-2. Los productos de la actividad de estas enzimas están involucrados en el dolor e inflamación característicos de esta enfermedad y en la elevada capacidad proliferativa de las lesiones endometriósicas.

Estudiamos el efecto de la inhibición de COX-2 y aromatasa sobre el establecimiento y crecimiento de las lesiones endometriósicas en ratón. Los resultados que obtuvimos demostraron la efectividad de celecoxib de disminuir tanto el establecimiento de las lesiones endometriósicas así como su desarrollo, reflejado en el menor número de lesiones y en la disminución del tamaño alcanzado por las lesiones desarrolladas en el grupo tratado respecto al grupo de ratones controles. Con respecto a anastrozole, si bien no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se administró este compuesto de forma individual, pudimos observar que provocó una clara tendencia a la inhibición del crecimiento de la lesión. Por otro lado, el tratamiento con los dos compuestos combinados no mejoraron ninguno de estos parámetros.

Estudios recientes advierten que la administración de agonistas del receptor nuclear PPAR γ en combinación con inhibidores selectivos de COX-2 resulta efectiva en la inhibición del crecimiento tumoral (159). Basándonos en esos datos y en nuestros estudios realizados en células en cultivo, administramos celecoxib en conjunto con rosiglitazona a los ratones y pudimos confirmar que, como en el experimento anterior, el tratamiento con celecoxib inhibió tanto el establecimiento como el crecimiento de las lesiones endometriósicas. Además, en este caso, la terapéutica combinada, tuvo efectos inhibitorios sobre el número de lesiones establecidas. De acuerdo a nuestros datos, podemos sugerir que celecoxib sería el responsable de la inhibición del número de lesiones provocada por la terapéutica combinada ya que la rosiglitazona administrada de manera individual no tuvo efecto sobre este parámetro y tampoco mejoró el resultado individual de celecoxib al administrarla de manera conjunta. Por lo tanto podemos especular que en el tiempo de tratamiento y con las dosis utilizadas, celecoxib resultaría ser un inhibidor más potente del establecimiento endometriósico que rosiglitazona.

Sin embargo, al analizar el establecimiento de los implantes endometriósicos en los ratones luego del tratamiento con anastrozole y celecoxib, observamos que no diferían de los animales controles y de los animales tratados solamente con anastrozole. En este caso podríamos especular que los efectos de anastrozole y celecoxib podrían ser antagónicos pero este dato se debería confirmar con estudios farmacológicos precisos.

Hemos observado además, que la administración de rosiglitazona a los ratones causó un efecto beneficioso ya que provocó una disminución en el tamaño de las lesiones endometriósicas. Si bien esta terapéutica individual al igual que el tratamiento con anastrozole y a diferencia de celecoxib, no modificó el número de lesiones por ratón es importante destacar que pocos tratamientos logran esta ansiada consecuencia y que para poder observar una disminución en el número de lesiones halladas, el compuesto que se administra debería ser tan potente que provoque una involución total de las mismas.

Para investigar acerca de los mecanismos implicados en la inhibición de la endometriosis experimental estudiamos la proliferación celular, la apoptosis y la densidad vascular en las lesiones endometriósicas desarrolladas luego de los distintos tratamientos administrados.

En el caso de la terapéutica combinada de anastrozole y celecoxib, observamos que cada uno de los compuestos administrados de manera independiente provocó un aumento significativo de la muerte celular y una disminución estadísticamente significativa de la proliferación. Sin embargo, no se observaron cambios en estos parámetros luego del tratamiento combinado. Al evaluar el desarrollo de la red vascular en las lesiones, observamos que solamente el tratamiento con el inhibidor de COX-2 administrado de manera individual, logró inhibir la vascularización.

Si bien se ha propuesto que celecoxib actuaría en forma sinérgica con inhibidores de aromatasa en el tratamiento del cáncer de mama (229) y que hay estudios que reportan mejoras leves con la terapia combinada (129,163), cabe destacar que otros investigadores ponen en duda que la combinación de ambas drogas aumente la eficiencia terapéutica (164).

En nuestro estudio, si bien los índices de inhibición del tamaño de las lesiones luego del tratamiento con anastrozole, no alcanzaron significancia estadística, el hecho de que hayamos encontrado una clara tendencia a la inhibición del crecimiento, una disminución significativa de los niveles de proliferación celular y un aumento significativo de los índices de apoptosis luego de su administración, nos dan indicio de la eficiencia potencial de su utilización. Además resultados previos de nuestro laboratorio hallaron una clara acción inhibitoria del desarrollo de la endometriosis experimental luego del tratamiento con inhibidores de aromatasa (102). Por lo tanto consideramos que los resultados que obtuvimos en nuestro trabajo son alentadores respecto al uso de anastrozole

y de celecoxib en forma individual en la terapéutica de la endometriosis y concuerdan con los autores que no hallan mejoras luego de la terapéutica combinada.

Estas mismas evaluaciones realizadas luego de administrar la combinación de celecoxib con rosiglitazona, nuevamente reprodujeron los resultados obtenidos previamente con celecoxib administrado de manera individual. Las lesiones endometriósicas presentaron una disminución significativa de células en activa proliferación celular, una reducción de la densidad vascular y un aumento de los niveles de apoptosis. Además, todos estos parámetros también mejoraron con la administración individual de rosiglitazona y con la terapia combinada. Sin embargo, en ningún caso obtuvimos un efecto benéfico adicional al combinar las drogas que al administrarlas por separado.

En cuanto a la inhibición del crecimiento y vascularización, y en concordancia con nuestros datos, se ha reportado que los inhibidores de COX-2 suprimen el crecimiento de tumores establecidos en animales, reducen el riesgo de cáncer en pacientes y previenen la tumorigénesis (162). Asimismo, se han probado diversos inhibidores selectivos de COX-2 en distintos modelos de roedores, y se ha demostrado su eficiencia en prevenir el establecimiento de los implantes endometriósicos (230) y el crecimiento de las lesiones ya establecidas (231,232). Además, el grupo de Ozawa demostró que kk51NS398, otro inhibidor de COX-2, posee actividad antiangiogénica en un modelo de endometriosis en ratones SCID (231).

Por otro lado, está descripto que las TZDs provocan la inhibición de la proliferación de células endoteliales (233,234), así como la inhibición de la angiogénesis mediada por dos potentes factores proangiogénicos, bFGF y VEGF (233). En células Ishikawa y en células endometriales humanas, se reportó que rosiglitazona inhibe la activación del promotor de VEGF y, en consecuencia, la secreción de VEGF al medio de cultivo (152). En endometriosis, Lebovic y colaboradores estudiaron el efecto de ciglitazona en un modelo de la enfermedad en rata y observaron una reducción en el tamaño de las lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente (154). Conforme a estos resultados, otro grupo demostró que el tratamiento con rosiglitazona fue efectivo en reducir el crecimiento de las lesiones endometriósicas y en causar la regresión de implantes establecidos en un modelo animal similar (153,224). Más recientemente, en un estudio realizado en babuinos se evaluó el efecto de rosiglitazona comparado con un antagonista de GnRH y se observó que solamente la TZD provocó la regresión de los implantes (155).

En nuestro trabajo, evaluamos también la expresión de COX-2 en las lesiones endometriósicas desarrolladas en los ratones tratados con los inhibidores de COX-2 y aromatasa. Si bien esta valoración fue cualitativa, fue clara en mostrar, en concordancia con lo reportado en la bibliografía, una mayor expresión de COX-2 en las células epiteliales endometriales que en las células

estromales (112). Además, se pudo observar que el tratamiento con el inhibidor de la actividad de la enzima provocó un aumento sobre la expresión de la misma, mientras que el inhibidor de aromatasa disminuyó esta expresión respecto al grupo control. Aparentemente, el tratamiento combinado de ambos inhibidores no modificó la inmunomarcación con respecto a la observada en las lesiones de los ratones del grupo control. Los resultados que obtuvimos acuerdan con el hecho ampliamente reportado, de que se produce una retroalimentación negativa entre el producto de la actividad de COX-2 y la expresión de la enzima. Luego, al inhibirse la síntesis de PGE₂, este efecto desaparece y la expresión de COX-2 se ve aumentada (126,194). Por otro lado, se sabe que el producto de la actividad de aromatasa estimula la actividad y expresión de COX-2 (99). Siendo así, la clara disminución de la expresión de COX-2 que observamos luego del tratamiento con anastrozole, es consistente con la interacción entre estas enzimas y sus productos.

En los grupos de ratones que tratamos con celecoxib y rosiglitazona, evaluamos también la expresión de caspasa-3 clivada y el contenido de metabolitos de PGE en el líquido peritoneal. A pesar de haber obtenido un aumento significativo de la apoptosis en todos los grupos de tratamiento, el resultado no se vio reflejado en la activación de caspasa-3. Solamente en el grupo tratado con rosiglitazona de manera individual, se observó una tendencia al aumento en la expresión de esta proteína, viéndose inalterada en los otros dos grupos. Este resultado nos sorprendió, y creemos que podría estar relacionado con limitaciones experimentales, aunque quedaría pendiente aún corroborar esta afirmación.

Para culminar evaluamos el contenido de prostaglandinas en el líquido peritoneal de los ratones y observamos que solamente el grupo que había sido tratado con el inhibidor de COX-2 presentaba una menor concentración de los metabolitos de PGE respecto al control. Este dato resultó coherente con el mecanismo de acción de celecoxib ya que actúa inhibiendo la actividad enzimática y por lo tanto, disminuyendo los niveles de su producto. Esta información resulta también complementaria a los resultados obtenidos *in vitro*, ya que previamente habíamos demostrado la capacidad de las células endometriales de sintetizar y liberar PGE₂ y la disminución de esta síntesis provocada por el agregado de celecoxib (193). El hecho de no obtener una disminución de este parámetro luego del tratamiento con rosiglitazona no nos sorprendió, ya que se ha reportado que el tratamiento con agonistas de PPAR γ no sólo no disminuye la síntesis de PGE sino que en algunos casos puede verse aumentada (235).

COMENTARIOS FINALES

Los inhibidores de aromatasa de tercera generación son utilizados de manera rutinaria como adyuvantes en el cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas y su tolerancia y eficacia son muy buenas. En los últimos años también se ha comenzado a pensar en ellos como una opción en el tratamiento de la endometriosis. Está extensamente reportada su eficacia en el tratamiento del dolor asociado a la endometriosis en varios ensayos clínicos que se han llevado a cabo, pero el impacto sobre la reducción del tamaño de los implantes endometriósicos no es tan claro (103,236). En las dosis terapéuticas utilizadas para el tratamiento del cáncer de mama y para la endometriosis los inhibidores de aromatasa podrían no tener efectos sobre la ovulación, pudiendo pensar en este tratamiento como factible para enfrentar los problemas asociados a la endometriosis, posiblemente en combinación con otras drogas (237-239). Al respecto, un estudio realizado en monos macaco hembra tratados con inhibidores de aromatasa demostró que a pesar de los bajos niveles de estradiol que se generaban, la ovulación no se vio interrumpida (237).

Por otro lado, en base a los resultados promisorios que se están obteniendo a nivel experimental, se está evaluando la posibilidad de incluir a las glitazonas en el tratamiento de mujeres con endometriosis. Recientemente, Moravek y colaboradores reportaron un efecto beneficioso luego de la administración de rosiglitazona a un número reducido de pacientes, mejorando los síntomas de la enfermedad y el dolor (240). Es de destacar que rosiglitazona no sólo no impide la ovulación (240) sino que incluso ayuda a restaurar la ovulación espontánea (241). Además, se reportó que rosiglitazona no causa ningún tipo de alteración en el feto de ratón si es administrada durante la preñez (242).

Los estudios publicados utilizando una terapia combinada de inhibidores de COX-2 y activadores de PPAR γ están focalizados en modelos de cáncer. Potenciar la actividad inhibitoria de COX-2 con la activación de PPAR γ ha resultado en efectos beneficiosos tanto en estudios realizados *in vivo* como *in vitro* (159,160). En el trabajo publicado por Mustafa y colegas, se reportó un aumento en la tasa de supervivencia en un modelo de cáncer de mama en ratón (159). En los parámetros que evaluamos a lo largo de este trabajo, si bien los efectos inhibitorios de la enfermedad por parte de celecoxib y rosiglitazona, son claros no obtuvimos diferencias significativas entre el tratamiento combinado y cada una de las drogas por separado. Sin embargo, podemos decir que existiría una tendencia a una mejora en cuanto a la proliferación celular, la apoptosis y la densidad vascular evaluadas.

La investigación básica y clínica en la terapéutica del cáncer muchas veces nos inicia en nuevas drogas utilizadas para inhibir la progresión tumoral que pueden ser pensadas también para detener el crecimiento de la lesión endometriósica. Los inhibidores de COX-2 fueron y son actualmente utilizados en numerosos ensayos preclínicos y clínicos en distintos tipos de cáncer. Asimismo celecoxib es el único AINE que está actualmente aprobado por la FDA para el tratamiento de la PAF. Este tipo de cáncer hereditario es responsable del 1% de los casos de cáncer colorrectal que se diagnostican (243). Además, son diversos los protocolos que han combinado la quimioterapia estándar con celecoxib para el tratamiento del cáncer (228,244-249). Celecoxib, ha mostrado ser el AINE más potente en inhibir la proliferación celular. Se ha observado que otros AINEs tradicionales y selectivos, si bien inhiben eficientemente la producción de PGE₂, no poseen las cualidades antiproliferativas que posee celecoxib (202). Además del tratamiento de la PAF, celecoxib está indicado para aliviar los síntomas de la artritis y osteoartritis, para la dismenorrea y luego de cirugías dentales u ortopédicas.

A pesar de que algunos investigadores están empezando a pensar en la opción de utilizar AINEs como posible terapéutica futura para la endometriosis (80,110,250,251), celecoxib no está siendo utilizado aún como alternativa médica para la regresión de las lesiones endometriósicas. Al respecto, sólo se ha realizado un estudio piloto con un pequeño grupo de pacientes con endometriosis a las que se les administró una dosis diaria de 25 mg de rofecoxib cuando este inhibidor todavía no había sido retirado del mercado. Este estudio sólo evaluó el efecto del tratamiento con el inhibidor de COX-2 sobre la progresión del dolor en endometriosis y mostró ser efectivo contra la dismenorrea, dispareunia y el dolor crónico que manifestaban las pacientes, sin demostrar efectos secundarios adversos (252).

Para el caso de la rosiglitazona, a pesar de que fue ampliamente utilizada en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo II, su comercialización fue recientemente desaconsejada por la FDA por poseer efectos cardiovasculares indeseados. Otra TZD, pioglitazona, está en evaluación y sería más segura que rosiglitazona (253,254), aunque existen controversias al respecto (255-257). A pesar de las advertencias que se están haciendo con algunas glitazonas, es importante aclarar que los eventos cardiovasculares se han hallado en pacientes diabéticos añosos con alto riesgo de contraer este tipo de complicaciones y se cree que estos efectos estarían minimizados en mujeres sanas y jóvenes, como son las pacientes con endometriosis.

CONCLUSIÓN

Hasta el momento, este es el primer estudio en utilizar una terapia que se dirige a más de una molécula en forma conjunta en modelos de endometriosis *in vivo* e *in vitro*. En el caso de la combinación del celecoxib con el inhibidor de aromatasa no podemos afirmar que el tratamiento de las lesiones endometriósicas en ratón hayan tenido algún beneficio adicional. Cuando la combinación del AINE se hizo con el agonista de PPAR γ , la inhibición de la enfermedad fue significativa y se observó una tendencia a ser más eficiente que cualquiera de los dos tratamientos por separado.

Los resultados presentados en este trabajo son promisorios. Avalan a celecoxib como una buena futura estrategia en el tratamiento para la endometriosis. Tanto en los experimentos realizados *in vitro* como *in vivo* no quedaron dudas que fue la droga más potente en las dosis y tiempos en los que se realizaron todos los trabajos. En principio, y basándonos en los resultados obtenidos, no podemos avalar la combinación de celecoxib con anastrozole, aunque consideramos que deberían realizarse más estudios para sustentar fehacientemente esta afirmación. Por otro lado, no descartamos la posibilidad de que la combinación con alguna glitazona pueda tener un efecto benéfico adicional. Por supuesto, que de encarar la activación de PPAR γ , se tendrá que apuntar a otro compuesto dadas las limitaciones recientemente impuestas, no podrá ser rosiglitazona la droga elegida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crosignani, P.; Olive, D.; Bergqvist, A. y col. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update* 2006;12:179-189.
2. Jenkins, S.; Olive, D.L. y Haney, A.F. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986;67:335-338.
3. Hilaris, G.E.; Payne, C.K.; Osias, J. y col. Synchronous rectovaginal, urinary bladder, and pulmonary endometriosis. *JSLs* 2005;9:78-82.
4. D'Hooghe, T.M.; Kyama, C.; Debrock, S. y col. Future directions in endometriosis research. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:316-325.
5. Valle, R.F. y Sciarra, J.J. Endometriosis: treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2003;997:229-239.
6. Ozkan, S.; Murk, W. y Arici, A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:92-100.
7. Child, T.J. y Tan, S.L. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs* 2001;61:1735-1750.
8. D'Hooghe, T.M.; Debrock, S.; Hill, J.A. y col. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med* 2003;21:243-254.
9. Meuleman, C.; Tomassetti, C.; D'Hoore, A. y col. Surgical treatment of deeply infiltrating endometriosis with colorectal involvement. *Hum Reprod Update* 2011;17:311-326.
10. Gazvani, R. y Templeton, A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76:117-126.
11. Milingos, S.; Protopapas, A.; Drakakis, P. y col. Laparoscopic management of patients with endometriosis and chronic pelvic pain. *Ann N Y Acad Sci* 2003;997:269-273.
12. Halis, G. y Arici, A. Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:300-315.
13. Bulletti, C.; Montini, A.; Setti, P.L. y col. Vaginal parturition decreases recurrence of endometriosis. *Fertil Steril* 2010;94:850-855.
14. Somigliana, E.; Benaglia, L.; Vigano', P. y col. Surgical measures for endometriosis-related infertility: a plea for research. *Placenta* 2011;32 Suppl 3:S238-S242.
15. Kyama, C.M.; Mihalyi, A.; Simsa, P. y col. Role of cytokines in the endometrial-peritoneal cross-talk and development of endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009;1:444-454.
16. Lessey, B.A.; Castelbaum, A.J.; Sawin, S.W. y col. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:643-649.
17. Wei, Q.; St Clair, J.B.; Fu, T. y col. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;91:1686-1691.
18. de Ziegler, D.; Borghese, B. y Chapron, C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 2010;376:730-738.
19. Kennedy, S.; Bergqvist, A.; Chapron, C. y col. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:2698-2704.
20. Rice, V.M. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:343-352.
21. Mihalyi, A.; Gevaert, O.; Kyama, C.M. y col. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum Reprod* 2010;25:654-664.
22. Mabrouk, M.; Elmakky, A.; Caramelli, E. y col. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2011;
23. Kyama, C.M.; Mihalyi, A.; Gevaert, O. y col. Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2011;95:1338-1343.

24. Classification of endometriosis. The American Fertility Society. *Fertil Steril* 1979;32:633-634.
25. ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-821.
26. Novak E. Pelvic endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1931;22:826-837.
27. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-469.
28. Halme, J.; Hammond, M.G.; Hulka, J.F. y col. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984;64:151-154.
29. Bartosik, D.; Jacobs, S.L. y Kelly, L.J. Endometrial tissue in peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1986;46:796-800.
30. Ridley, J.H. y Edwards, I.K. Experimental endometriosis in the human. *Am J Obstet Gynecol* 1958;76:783-789.
31. Olive, D.L. y Henderson, D.Y. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 1987;69:412-415.
32. Sanfilippo, J.S.; Wakim, N.G.; Schikler, K.N. y col. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:39-43.
33. Groothuis, P.G.; Nap, A.W.; Winterhager, E. y col. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005;8:147-156.
34. Vigano, P.; Parazzini, F.; Somigliana, E. y col. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:177-200.
35. Kennedy, S. The genetics of endometriosis. *J Reprod Med* 1998;43:263-268.
36. Moen, M.H. Endometriosis in monozygotic twins. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994;73:59-62.
37. Lamb, K.; Hoffmann, R.G. y Nichols, T.R. Family trait analysis: a case-control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:596-601.
38. Malinak, L.R.; Buttram, V.C., Jr.; Elias, S. y col. Heritage aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:332-337.
39. Di Blasio, A.M.; Di Francesco, S.; Abbiati, A. y col. Genetics of endometriosis. *Minerva Ginecol* 2005;57:225-236.
40. Bulletti, C.; DE, Z.D.; Setti, P.L. y col. The patterns of uterine contractility in normal menstruating women: from physiology to pathology. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:64-83.
41. Dmowski WP y Braun, D.P. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:245-263.
42. Wu, M.Y.; Yang, J.H.; Chao, K.H. y col. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000;74:1187-1191.
43. Wilson, T.J.; Hertzog, P.J.; Angus, D. y col. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* 1994;62:1086-1088.
44. Oosterlynck, D.J.; Cornillie, F.J.; Waer, M. y col. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991;56:45-51.
45. Hill, J.A. Immunology and endometriosis. *Fertil Steril* 1992;58:262-264.
46. Vigano, P.; Gaffuri, B.; Somigliana, E. y col. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod* 1998;4:1150-1156.
47. Somigliana, E.; Vigano, P.; Gaffuri, B. y col. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1996;36:295-300.
48. Cornillie, F.J.; Lauweryns, J.M.; Seppala, M. y col. Expression of endometrial protein PP14 in pelvic and ovarian endometriotic implants. *Hum Reprod* 1991;6:1411-1415.

49. Gazvani, R. y Templeton, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002;123:217-226.
50. Raiter-Tenenbaum, A.; Baranao, R.I.; Etchepareborda, J.J. y col. Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 1998;261:147-157.
51. Halme, J. y Surrey, E.S. Endometriosis and infertility: the mechanisms involved. *Prog Clin Biol Res* 1990;323:157-178.
52. Vinatier, D.; Dufour, P. y Oosterlynck, D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996;2:371-384.
53. Dunselman, G.A.; Hendrix, M.G.; Bouckaert, P.X. y col. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertil* 1988;82:707-710.
54. Taketani, Y.; Kuo, T.M. y 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;167:265-270.
55. Mier-Cabrera, J.; Jimenez-Zamudio, L.; Garcia-Latorre, E. y col. Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *BJOG* 2011;118:6-16.
56. Takayama, K.; Zeitoun, K.; Gunby, R.T. y col. Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 1998;69:709-713.
57. Ailawadi, R.K.; Jobanputra, S.; Kataria, M. y col. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004;81:290-296.
58. Eskenazi, B. y Warner, M.L. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997;24:235-258.
59. Bulun, S.E.; Gurates, B.; Fang, Z. y col. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002;55:21-33.
60. Tenenbaum, A.; Baraña, R.I.; Etchepareborda, J.J. y col. Functional alterations of peritoneal macrophages in patients with mild endometriosis. 1994.
61. Kitawaki, J.; Kado, N.; Ishihara, H. y col. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;83:149-155.
62. Fujishita, A.; Nakane, P.K.; Koji, T. y col. Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil Steril* 1997;67:856-864.
63. Wieser, F.; Schneeberger, C.; Tong, D. y col. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:309-312.
64. Near, A.M.; Wu, A.H.; Templeman, C. y col. Progesterone receptor gene polymorphisms and risk of endometriosis: results from an international collaborative effort. *Fertil Steril* 2011;95:40-45.
65. Attia, G.R.; Zeitoun, K.; Edwards, D. y col. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2897-2902.
66. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
67. Dmowski, W.P.; Ding, J.; Shen, J. y col. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001;16:1802-1808.
68. Ulukus, M.; Cakmak, H. y Arici, A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:467-476.
69. Johnson, M.C.; Torres, M.; Alves, A. y col. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:45-52.
70. Sharpe-Timms, K.L. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;943:131-147.

71. Dmowski, W.P.; Gebel, H. y Braun, D.P. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4:696-701.
72. Meresman, G.F.; Vighi, S.; Buquet, R.A. y col. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000;74:760-766.
73. Gebel, H.M.; Braun, D.P.; Tambur, A. y col. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998;69:1042-1047.
74. Bulun, S.E.; Fang, Z.; Imir, G. y col. Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2004;22:45-50.
75. Kitawaki, J.; Noguchi, T.; Amatsu, T. y col. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 1997;57:514-519.
76. Attar, E. y Bulun, S.E. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 2006;12:49-56.
77. Jabbour, H.N.; Sales, K.J.; Smith, O.P. y col. Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Mol Cell Endocrinol* 2006;252:191-200.
78. Bulun, S.E.; Imir, G.; Utsunomiya, H. y col. Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;95:57-62.
79. Meresman, G.F.; Auge, L.; Baranao, R.I. y col. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:1141-1147.
80. Ferrero, S.; Abbamonte, L.H.; Anserini, P. y col. Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Surv* 2005;60:817-826.
81. Olive, D.L. Optimizing gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in women with endometriosis. *Treat Endocrinol* 2004;3:83-89.
82. Vercellini, P.; Somigliana, E.; Viganò, P. y col. Endometriosis: current and future medical therapies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008;22:275-306.
83. Busacca, M.; Somigliana, E.; Bianchi, S. y col. Post-operative GnRH analogue treatment after conservative surgery for symptomatic endometriosis stage III-IV: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001;16:2399-2402.
84. Luciano, A.A.; Turksoy, R.N. y Carleo, J. Evaluation of oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol* 1988;72:323-327.
85. Schweppe, K.W. Current place of progestins in the treatment of endometriosis-related complaints. *Gynecol Endocrinol* 2001;15 Suppl 6:22-28.
86. Blei, F.; Wilson, E.L.; Mignatti, P. y col. Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. *J Cell Physiol* 1993;155:568-578.
87. Vercellini, P.; Fedele, L.; Pietropaolo, G. y col. Progestogens for endometriosis: forward to the past. *Hum Reprod Update* 2003;9:387-396.
88. Chang, S.P. y Ng, H.T. A randomized comparative study of the effect of leuprorelin acetate depot and danazol in the treatment of endometriosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1996;57:431-437.
89. Fraser, I.S.; Shearman, R.P.; Jansen, R.P. y col. A comparative treatment trial of endometriosis using the gonadotrophin-releasing hormone agonist, nafarelin, and the synthetic steroid, danazol. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1991;31:158-163.
90. Telimaa, S.; Puolakka, J.; Ronnberg, L. y col. Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 1987;1:13-23.
91. Rotondi, M.; Labriola, D.; Rotondi, M. y col. Depot leuprorelin acetate versus danazol in the treatment of infertile women with symptomatic endometriosis. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;23:523-526.

92. Simpson, E.R.; Zhao, Y.; Agarwal, V.R. y col. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1997;52:185-213.
93. Conley, A. y Hinshelwood, M. Mammalian aromatases. *Reproduction* 2001;121:685-695.
94. Roselli, C.E. y Resko, J.A. Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;44:499-508.
95. Stratakis, C.A.; Vottero, A.; Brodie, A. y col. The aromatase excess syndrome is associated with feminization of both sexes and autosomal dominant transmission of aberrant P450 aromatase gene transcription. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1348-1357.
96. Bulun, S.E.; Noble, L.S.; Takayama, K. y col. Endocrine disorders associated with inappropriately high aromatase expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;61:133-139.
97. Zeitoun, K.M. y Bulun, S.E. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril* 1999;72:961-969.
98. Noble, L.S.; Takayama, K.; Zeitoun, K.M. y col. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:600-606.
99. Bulun, S.E.; Zeitoun, K.M.; Takayama, K. y col. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol* 2000;25:35-42.
100. Beresford, M.; Tumor, I.; Chakrabarti, J. y col. A qualitative systematic review of the evidence base for non-cross-resistance between steroidal and non-steroidal aromatase inhibitors in metastatic breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2011;23:209-215.
101. Meresman, G.F.; Bilotas, M.; Abello, V. y col. Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84:459-463.
102. Bilotas, M.; Meresman, G.; Stella, I. y col. Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. *Fertil Steril* 2010;93:2513-2518.
103. Ferrero, S.; Gillott, D.J.; Venturini, P.L. y col. Use of aromatase inhibitors to treat endometriosis-related pain symptoms: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:89-112.
104. Chandrasekharan, N.V.; Dai, H.; Roos, K.L. y col. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13926-13931.
105. Chandrasekharan, N.V. y Simmons, D.L. The cyclooxygenases. *Genome Biol* 2004;5:241-247.
106. Hwang, D.; Scollard, D.; Byrne, J. y col. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-460.
107. Kitamura, T.; Kawamori, T.; Uchiya, N. y col. Inhibitory effects of mofezolac, a cyclooxygenase-1 selective inhibitor, on intestinal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002;23:1463-1466.
108. Sales, K.J.; Katz, A.A.; Howard, B. y col. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res* 2002;62:424-432.
109. Fortier, M.A.; Krishnaswamy, K.; Danyod, G. y col. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 1:65-89.
110. Ebert, A.D.; Bartley, J. y David, M. Aromatase inhibitors and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in endometriosis: new questions--old answers? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;122:144-150.
111. Matsuzaki, S.; Canis, M.; Pouly, J.L. y col. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertil Steril* 2004;82:1309-1315.
112. Ota, H.; Igarashi, S.; Sasaki, M. y col. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 2001;16:561-566.

113. Wu, M.H.; Sun, H.S.; Lin, C.C. y col. Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1103-1110.
114. Wu, M.H.; Lu, C.W.; Chuang, P.C. y col. Prostaglandin E2: the master of endometriosis? *Exp Biol Med (Maywood)* 2010;235:668-677.
115. Banu, S.K.; Lee, J.; Speights, V.O., Jr. y col. Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinology* 2008;149:1180-1189.
116. Wu, M.H.; Shoji, Y.; Wu, M.C. y col. Suppression of matrix metalloproteinase-9 by prostaglandin E(2) in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis. *Am J Pathol* 2005;167:1061-1069.
117. Huang, J.C. y Dawood, M.Y. Gene transfer to cultured human endometrial stromal cells: a model to study cyclooxygenase-2 gene regulation. *Fertil Steril* 1998;70:734-739.
118. Gately, S. y Li, W.W. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2004;31:2-11.
119. Liu, X.H.; Kirschenbaum, A.; Lu, M. y col. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem* 2002;277:50081-50086.
120. Mahnke, J.L.; Dawood, M.Y. y Huang, J.C. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000;73:166-170.
121. Tamura, K.; Sakurai, T. y Kogo, H. Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 2006;44:411-416.
122. Wadman, M. The pain game. *Nature* 2007;448:400-401.
123. Efstathiou, J.A.; Sampson, D.A.; Levine, Z. y col. Nonsteroidal antiinflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model. *Fertil Steril* 2005;83:171-181.
124. Laschke, M.W.; Elitzsch, A.; Scheuer, C. y col. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 2007;87:163-171.
125. Machado, D.E.; Berardo, P.T.; Landgraf, R.G. y col. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril* 2010;93:2674-2679.
126. Basu, G.D.; Pathangey, L.B.; Tinder, T.L. y col. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R422-R435.
127. Chun, K.S. y Surh, Y.J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1089-1100.
128. Basu, G.D.; Tinder, T.L.; Bradley, J.M. y col. Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances the efficacy of a breast cancer vaccine: role of IDO. *J Immunol* 2006;177:2391-2402.
129. Falandry, C.; Canney, P.A.; Freyer, G. y col. Role of combination therapy with aromatase and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2009;20:615-620.
130. Iwama, T. NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 19:72-76.
131. Lynch, P.M.; Ayers, G.D.; Hawk, E. y col. The safety and efficacy of celecoxib in children with familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1437-1443.
132. Issemann, I. y Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-650.
133. Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H. y col. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 1992;68:879-887.
134. Berger, J. y Moller, D.E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-435.

135. Miyata, K.S.; McCaw, S.E.; Marcus, S.L. y col. The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene* 1994;148:327-330.
136. Mangelsdorf, D.J.; Borgmeyer, U.; Heyman, R.A. y col. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992;6:329-344.
137. Desvergne, B. y Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-688.
138. Berger, J.P.; Akiyama, T.E. y Meinke, P.T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:244-251.
139. Froment, P.; Gizard, F.; Defever, D. y col. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol* 2006;189:199-209.
140. Seimandi, M.; Lemaire, G.; Pillon, A. y col. Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem* 2005;344:8-15.
141. Cui, Y.; Miyoshi, K.; Claudio, E. y col. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARGamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem* 2002;277:17830-17835.
142. McKinnon, B.; Bersinger, N.A.; Huber, A.W. y col. PPAR-gamma expression in peritoneal endometriotic lesions correlates with pain experienced by patients. *Fertil Steril* 2010;93:293-296.
143. Wanichkul, T.; Han, S.; Huang, R.P. y col. Cytokine regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human endometrial cells. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 1:763-769.
144. Magenta, G.; Borenstein, X.; Rolando, R. y col. Rosiglitazone inhibits metastasis development of a murine mammary tumor cell line LMM3. *BMC Cancer* 2008;8:47-57.
145. Kim, S.W.; Choi, O.K.; Chang, M.S. y col. Thiazolidinediones inhibit the growth of PC12 cells both in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371:197-202.
146. Panigrahy, D.; Singer, S.; Shen, L.Q. y col. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002;110:923-932.
147. Koeffler, H.P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:1-9.
148. McKinnon, B.; Bersinger, N.A. y Mueller, M.D. Peroxisome proliferating activating receptor gamma-independent attenuation of interleukin 6 and interleukin 8 secretion from primary endometrial stromal cells by thiazolidinediones. *Fertil Steril* 2012;97:657-664.
149. Hornung, D.; Waite, L.L.; Ricke, E.A. y col. Nuclear peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma have opposing effects on monocyte chemotaxis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3108-3114.
150. Kavoussi, S.K.; Witz, C.A.; Binkley, P.A. y col. Peroxisome-proliferator activator receptor-gamma activation decreases attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelial cells in an in vitro model of the early endometriotic lesion. *Mol Hum Reprod* 2009;15:687-692.
151. Ohama, Y.; Harada, T.; Iwabe, T. y col. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand reduced tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production and growth in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 2008;89:311-317.
152. Peeters, L.L.; Vigne, J.L.; Tee, M.K. y col. PPARgamma represses VEGF expression in human endometrial cells: implications for uterine angiogenesis. *Angiogenesis* 2005;8:373-379.
153. Aytan, H.; Caliskan, A.C.; Demirturk, F. y col. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces the size of experimental endometriosis in the rat model. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2007;47:321-325.
154. Lebovic, D.I.; Kir, M. y Casey, C.L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *Fertil Steril* 2004;82 Suppl 3:1008-1013.

155. Lebovic, D.I.; Mwenda, J.M.; Chai, D.C. y col. PPAR-gamma receptor ligand induces regression of endometrial explants in baboons: a prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study. *Fertil Steril* 2007;88:1108-1119.
156. Badawi, A.F. y Badr, M.Z. Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and levels of prostaglandin E2 and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human breast cancer and metastasis. *Int J Cancer* 2003;103:84-90.
157. Eibl, G. The Role of PPAR-gamma and Its Interaction with COX-2 in Pancreatic Cancer. *PPAR Res* 2008;2008:326915-326920.
158. Hazra, S.; Peebles, K.A.; Sharma, S. y col. The Role of PPARgamma in the Cyclooxygenase Pathway in Lung Cancer. *PPAR Res* 2008;2008:790568-790574.
159. Mustafa, A. y Kruger, W.D. Suppression of tumor formation by a cyclooxygenase-2 inhibitor and a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist in an in vivo mouse model of spontaneous breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4935-4942.
160. Sun, W.H.; Chen, G.S.; Ou, X.L. y col. Inhibition of COX-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma synergistically inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009;275:247-255.
161. Brueggemeier, R.W.; Diaz-Cruz, E.S.; Li, P.K. y col. Translational studies on aromatase, cyclooxygenases, and enzyme inhibitors in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;95:129-136.
162. Bundred, N.J. y Barnes, N.L. Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93 Suppl 1:S10-S15.
163. Chow, L.W.; Yip, A.Y.; Loo, W.T. y col. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;111:13-17.
164. Dirix, L.Y.; Ignacio, J.; Nag, S. y col. Treatment of advanced hormone-sensitive breast cancer in postmenopausal women with exemestane alone or in combination with celecoxib. *J Clin Oncol* 2008;26:1253-1259.
165. Lehmann, J.M.; Lenhard, J.M.; Oliver, B.B. y col. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997;272:3406-3410.
166. Wu, Y. y Guo, S.W. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor agonists synergistically suppress proliferation of immortalized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2009;91:2142-2147.
167. Meresman, G.F.; Bilotas, M.; Buquet, R.A. y col. Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2003;80 Suppl 2:702-707.
168. Meresman, G.F.; Baranao, R.I.; Tenenbaum, A. y col. Effect of peritoneal fluid from patients with mild and severe endometriosis on endometrial stromal cell proliferation. *Arch Gynecol Obstet* 1997;259:109-115.
169. Ribble, D.; Goldstein, N.B.; Norris, D.A. y col. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 2005;5:12-18.
170. Abrams, J.M.; White, K.; Fessler, L.I. y col. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1993;117:29-43.
171. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
172. Satyaswaroop, P.G.; Zaino, R.J. y Mortel, R. Human endometrial adenocarcinoma transplanted into nude mice: growth regulation by estradiol. *Science* 1983;219:58-60.
173. Mo, B.; Vendrov, A.E.; Palomino, W.A. y col. ECC-1 cells: a well-differentiated steroid-responsive endometrial cell line with characteristics of luminal epithelium. *Biol Reprod* 2006;75:387-394.
174. Castro-Rivera, E.; Wormke, M. y Safe, S. Estrogen and aryl hydrocarbon responsiveness of ECC-1 endometrial cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999;150:11-21.

175. Tabibzadeh, S.; Kaffka, K.L.; Kilian, P.L. y col. Human endometrial epithelial cell lines for studying steroid and cytokine actions. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26:1173-1179.
176. Ricci, A.G.; Olivares, C.N.; Bilotas, M.A. y col. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition on Endometrial Implant Development in a Murine Model of Endometriosis. *Reprod Sci* 2011;18:614-622.
177. Olivares, C.; Ricci, A.; Bilotas, M. y col. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 2011;96:428-433.
178. Fang, Z.; Yang, S.; Gurates, B. y col. Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3460-3466.
179. Leahy, K.M.; Ornberg, R.L.; Wang, Y. y col. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002;62:625-631.
180. Bock, F.; Onderka, J.; Dietrich, T. y col. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2545-2552.
181. Peluffo, G.D.; Stillitani, I.; Rodriguez, V.A. y col. Reduction of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in murine lung adenocarcinoma by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Int J Cancer* 2004;110:825-830.
182. Barnes, N.L.; Warnberg, F.; Farnie, G. y col. Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *Br J Cancer* 2007;96:575-582.
183. Kisley, L.R.; Barrett, B.S.; Dwyer-Nield, L.D. y col. Celecoxib reduces pulmonary inflammation but not lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* 2002;23:1653-1660.
184. Gupta, S.; Adhami, V.M.; Subbarayan, M. y col. Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer Res* 2004;64:3334-3343.
185. Jacoby, R.F.; Seibert, K.; Cole, C.E. y col. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 2000;60:5040-5044.
186. Brodie, A.; Jelovac, D. y Long, B.J. Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. *Clin Cancer Res* 2003;9:455S-459S.
187. Ogata, K.; Kurki, P.; Celis, J.E. y col. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 1987;168:475-486.
188. Steiner, I.; Jung, K.; Miller, K. y col. Expression of endothelial factors in prostate cancer: a possible role of caveolin-1 for tumour progression. *Oncol Rep* 2012;27:389-395.
189. Mineo, T.C.; Ambrogi, V.; Baldi, A. y col. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004;57:591-597.
190. Allen, R.T.; Hunter, W.J., III y Agrawal, D.K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997;37:215-228.
191. Bilotas, M.; Baranao, R.I.; Buquet, R. y col. Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod* 2007;22:644-653.
192. Graham, P.H. Anastrozole for malignant and benign conditions: present applications and future therapeutic integrations. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:2347-2357.
193. Olivares, C.; Bilotas, M.; Buquet, R. y col. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008;23:2701-2708.
194. Ohneseit, P.A.; Krebiehl, G.; Dittmann, K. y col. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity by celecoxib does not lead to radiosensitization of human prostate cancer cells in vitro. *Radiother Oncol* 2007;82:229-238.
195. Elrod, H.A. y Sun, S.Y. PPARgamma and Apoptosis in Cancer. *PPAR Res* 2008;2008:704165-

196. Fleming, H. Structure and function of cultured endometrial epithelial cells. *Semin Reprod Endocrinol* 1999;17:93-106.
197. Kazanov, D.; Dvory-Sobol, H.; Pick, M. y col. Celecoxib but not rofecoxib inhibits the growth of transformed cells in vitro. *Clin Cancer Res* 2004;10:267-271.
198. Wei, D.; Wang, L.; He, Y. y col. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res* 2004;64:2030-2038.
199. Wu, T.; Leng, J.; Han, C. y col. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3:299-307.
200. Connolly, E.M.; Harmey, J.H.; O'Grady, T. y col. Cyclo-oxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *Br J Cancer* 2002;87:231-237.
201. Maier, T.J.; Schilling, K.; Schmidt, R. y col. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1469-1478.
202. Kardosh, A.; Blumenthal, M.; Wang, W.J. y col. Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther* 2004;3:55-62.
203. Zhu, J.; Huang, J.W.; Tseng, P.H. y col. From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res* 2004;64:4309-4318.
204. Kulp, S.K.; Yang, Y.T.; Hung, C.C. y col. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:1444-1451.
205. Grosch, S.; Maier, T.J.; Schiffmann, S. y col. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:736-747.
206. Lai, G.H.; Zhang, Z. y Sirica, A.E. Celecoxib acts in a cyclooxygenase-2-independent manner and in synergy with emodin to suppress rat cholangiocarcinoma growth in vitro through a mechanism involving enhanced Akt inactivation and increased activation of caspases-9 and -3. *Mol Cancer Ther* 2003;2:265-271.
207. Han, C.; Leng, J.; Demetris, A.J. y col. Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004;64:1369-1376.
208. Jendrossek, V.; Handrick, R. y Belka, C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 2003;17:1547-1549.
209. Kong, B.; Tian, Y.; Zhu, W. y col. Effects of celecoxib and nimesulide on the proliferation of ectopic endometrial stromal cells in vitro. *J Int Med Res* 2008;36:1032-1038.
210. Dandekar, D.S.; Lopez, M.; Carey, R.I. y col. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2005;115:484-492.
211. Liu, X.; Yue, P.; Zhou, Z. y col. Death receptor regulation and celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1769-1780.
212. Kim, S.H.; Song, S.H.; Kim, S.G. y col. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:551-560.
213. Grosch, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E. y col. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001;15:2742-2744.
214. Pang, R.P.; Zhou, J.G.; Zeng, Z.R. y col. Celecoxib induces apoptosis in COX-2 deficient human gastric cancer cells through Akt/GSK3beta/NAG-1 pathway. *Cancer Lett* 2007;251:268-277.

215. Munkarah, A.R.; Genhai, Z.; Morris, R. y col. Inhibition of paclitaxel-induced apoptosis by the specific COX-2 inhibitor, NS398, in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2003;88:429-433.
216. Maier, T.J.; Janssen, A.; Schmidt, R. y col. Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J* 2005;19:1353-1355.
217. Patel, M.I.; Subbaramaiah, K.; Du, B. y col. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 2005;11:1999-2007.
218. McLaren, J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000;6:45-55.
219. Li, G.; Yang, T. y Yan, J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:886-890.
220. Liu, X.H.; Kirschenbaum, A.; Yao, S. y col. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:687-694.
221. Tauler, J. y Mulshine, J.L. Combination Therapy of PPARgamma Ligands and Inhibitors of Arachidonic Acid in Lung Cancer. *PPAR Res* 2008;2008:750238-750244.
222. Blanquicett, C.; Roman, J. y Hart, C.M. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 2008;6:25-34.
223. McKinnon, B.; Bersinger, N.A. y Mueller, M.D. Peroxisome proliferating activating receptor gamma-independent attenuation of interleukin 6 and interleukin 8 secretion from primary endometrial stromal cells by thiazolidinediones. *Fertil Steril* 2011;
224. Demirturk, F.; Aytan, H.; Caliskan, A.C. y col. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone on the induction of endometriosis in an experimental rat model. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:58-62.
225. Cellai, I.; Benvenuti, S.; Luciani, P. y col. Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPARgamma transactivation in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 2006;95:879-888.
226. Mossner, R.; Schulz, U.; Kruger, U. y col. Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit cell growth in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2002;119:576-582.
227. Fife, R.S.; Stott, B. y Carr, R.E. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cancer cells in vitro. *Cancer Biol Ther* 2004;3:228-232.
228. Chow, L.W.; Wong, J.L. y Toi, M. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer: preliminary report. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86:443-447.
229. Goss, P.E. y Strasser-Weippl, K. Prevention strategies with aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2004;10:372S-379S.
230. Matsuzaki, S.; Canis, M.; Darcha, C. y col. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004;82:1609-1615.
231. Ozawa, Y.; Murakami, T.; Tamura, M. y col. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis xenografts via antiangiogenic activity in severe combined immunodeficiency mice. *Fertil Steril* 2006;86 Suppl 4:1146-1151.
232. Dogan, E.; Saygili, U.; Posaci, C. y col. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril* 2004;82 Suppl 3:1115-1120.
233. Aljada, A.; O'Connor, L.; Fu, Y.Y. y col. PPARgamma ligands, rosiglitazone and pioglitazone, inhibit bFGF- and VEGF-mediated angiogenesis. *Angiogenesis* 2008;11:361-367.
234. Sheu, W.H.; Ou, H.C.; Chou, F.P. y col. Rosiglitazone inhibits endothelial proliferation and angiogenesis. *Life Sci* 2006;78:1520-1528.

235. Bishop-Bailey, D. y Warner, T.D. PPARgamma ligands induce prostaglandin production in vascular smooth muscle cells: indomethacin acts as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist. *FASEB J* 2003;17:1925-1927.
236. Nothnick, W.B. y Zhang, X. Future targets in endometriosis treatment: targeting the endometriotic implant. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:324-328.
237. Selvaraj, N.; Bhatnagar, A.S. y Moudgal, N.R. Is there a role for estrogen in follicular maturation in the primate? *Endocrine* 1995;3:245-249.
238. Bulun, S.E.; Zeitoun, K.M.; Takayama, K. y col. Molecular basis for treating endometriosis with aromatase inhibitors. *Hum Reprod Update* 2000;6:413-418.
239. Abushahin, F.; Goldman, K.N.; Barbieri, E. y col. Aromatase inhibition for refractory endometriosis-related chronic pelvic pain. *Fertil Steril* 2011;96:939-942.
240. Moravek, M.B.; Ward, E.A. y Lebovic, D.I. Thiazolidinediones as Therapy for Endometriosis: A Case Series. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68:167-170.
241. Sepilian, V. y Nagamani, M. Effects of rosiglitazone in obese women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:60-65.
242. Klinkner, D.B.; Lim, H.J.; Strawn, E.Y., Jr. y col. An in vivo murine model of rosiglitazone use in pregnancy. *Fertil Steril* 2006;86:1074-1079.
243. Fujimura, T.; Ohta, T.; Oyama, K. y col. Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience. *World J Gastroenterol* 2006;12:1336-1345.
244. Pruthi, R.S.; Derksen, J.E. y Moore, D. A pilot study of use of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in recurrent prostate cancer after definitive radiation therapy or radical prostatectomy. *BJU Int* 2004;93:275-278.
245. Choy, H. y Milas, L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1440-1452.
246. Reardon, D.A.; Quinn, J.A.; Vredenburgh, J. y col. Phase II trial of irinotecan plus celecoxib in adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 2005;103:329-338.
247. Merchan, J.R.; Jayaram, D.R.; Supko, J.G. y col. Increased endothelial uptake of paclitaxel as a potential mechanism for its antiangiogenic effects: potentiation by Cox-2 inhibition. *Int J Cancer* 2005;113:490-498.
248. Milella, M.; Gelibter, A.; Di Cosimo, S. y col. Pilot study of celecoxib and infusional 5-fluorouracil as second-line treatment for advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 2004;101:133-138.
249. Ducreux, M.; Kohne, C.H.; Schwartz, G.K. y col. Irinotecan in metastatic colorectal cancer: dose intensification and combination with new agents, including biological response modifiers. *Ann Oncol* 2003;14 Suppl 2:ii17-ii23.
250. Mihalyi, A.; Simsa, P.; Mutinda, K.C. y col. Emerging drugs in endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2006;11:503-524.
251. Vercellini, P.; Crosignani, P.; Somigliana, E. y col. 'Waiting for Godot': a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2011;26:3-13.
252. Cobellis, L.; Razzi, S.; De Simone, S. y col. The treatment with a COX-2 specific inhibitor is effective in the management of pain related to endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;116:100-102.
253. Tolman, K.G. The safety of thiazolidinediones. *Expert Opin Drug Saf* 2011;10:419-428.
254. Schernthaner, G. y Chilton, R.J. Cardiovascular risk and thiazolidinediones--what do meta-analyses really tell us? *Diabetes Obes Metab* 2010;12:1023-1035.
255. Saryusz-Wolska, M.; Szymanska-Garbacz, E.; Jablkowski, M. y col. Rosiglitazone treatment in nondiabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Pol Arch Med Wewn* 2011;121:61-66.

256. Yee, M.S.; Pavitt, D.V.; Dhanjil, S. y col. The effects of rosiglitazone on atherosclerotic progression in patients with Type 2 diabetes at high cardiovascular risk. *Diabet Med* 2010;27:1392-1400.
257. Gerstein, H.C.; Ratner, R.E.; Cannon, C.P. y col. Effect of rosiglitazone on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: the assessment on the prevention of progression by rosiglitazone on atherosclerosis in diabetes patients with cardiovascular history trial. *Circulation* 2010;121:1176-1187.