
Trabajo Original

Evaluación de nuevas posibles terapias para la endometriosis

Evaluation of new potential therapies for endometriosis
Dra. Gabriela Meresman, Dra. Mariela Bilotas, Lic. Carla Olivares,
Lic. Analía Ricci, Lic. Juan Ignacio Bastón, Dra. Rosa Inés Barañao

Laboratorio de Inmunología de la Reproducción
Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET
Vuelta de Obligado 2490 (C1428ADN) CABA, Argentina
E-mail: rbaranao@dna.uba.ar

Resumen

Los tratamientos médicos aplicados hasta el momento para las pacientes con endometriosis se basan en que el endometrio ectópico responde a las hormonas sexuales esteroideas de manera semejante al endometrio eutópico. Por ello estos tratamientos tienden a modificar los niveles de hormonas esteroideas y de esta manera inhibir la proliferación de las lesiones.

Sin embargo, ninguna de las alternativas terapéuticas de las que se dispone actualmente es enteramente eficaz y la búsqueda de nuevos tratamientos médicos para esta patología continúa.

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos en un modelo de endometriosis murina con posibles nuevas alternativas terapéuticas, como son el empleo de inhibidores de la aromatasa (letrozole y anastrozole), el uso de un inhibidor selectivo de la enzima COX-2 (celecoxib) solo o combinado con un agonista de los PPAR γ , como la rosiglitazona, y finalmente, un inhibidor de la angiogénesis, el bevacizumab.

Todos estos tratamientos ensayados fueron efectivos para disminuir el tamaño de las lesiones, la proliferación celular y la producción de factores angiogénicos al tiempo que aumentaron la apoptosis en las lesiones. Hasta el momento, sólo el inhibidor de la COX-2, solo o combinado con rosiglitazona, fue efectivo para disminuir el número de lesiones desarrolladas.

Estos resultados refuerzan la idea de continuar investigando otras opciones terapéuticas para la endometriosis.

Palabras clave: endometriosis, inhibidores de la aromatasa, inhibidores de la COX-2, rosiglitazona, VEGF, inhibidores de angiogénesis.

Abstract

Medical treatments applied so far in patients with endometriosis are based on the fact that the ectopic endometrium responds to steroid sex hormones in a similar manner to eutopic endometrium. Therefore, these treatments tend to alter steroid hormone levels and thereby inhibit the proliferation of injuries.

However, none of the therapeutic alternatives currently available is fully effective and the search for new medical treatments for this condition continues.

This paper presents the results obtained in a murine model of endometriosis with potential new therapies such as the use of aromatase inhibitors (anastrozole and letrozole), the use of a selective inhibitor of the enzyme COX2 (celecoxib) alone or combined with a PPAR γ agonist such as rosiglitazone, and finally a inhibitor of angiogenesis, such as bevacizumab.

All these treatments tested were effective in decreasing the size of lesions, cell proliferation and production of angiogenic factors while increasing apoptosis in the lesions. So far only the COX-2 inhibitor alone or in combination with rosiglitazone was effective in decreasing the number of lesions developed.

These results reinforce the idea of continuing to investigate other treatment options for endometriosis.

Key words: endometriosis, aromatase inhibitors, COX-2, rosiglitazone, VEGF, angiogenesis inhibitors.

Introducción

La endometriosis es una de las enfermedades ginecológicas benignas más frecuentes en mujeres durante su edad reproductiva¹. Se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina y afecta aproximadamente al 10% de esta población², mientras que la prevalencia en las mujeres que presentan infertilidad varía entre el 35 y el 50%¹.

Hasta la fecha, la teoría más aceptada para explicar la etiología de la endometriosis es la teoría de la implantación propuesta por Sampson, que sugiere el paso de fluido menstrual retrógrado a través de las trompas de Falopio y su posterior implantación en la cavidad peritoneal³, adjudicándole un origen eutópico a las lesiones endometriósicas.

El endometrio ectópico responde a las hormonas sexuales esteroideas de manera semejante al endometrio eutópico; por este motivo, los tratamientos médicos que se les aplican actualmente a las pacientes

con endometriosis se han basado en alterar el ambiente esteroideo y de esta manera inhibir la proliferación de las lesiones. Sin embargo, se sabe que estos tratamientos no son del todo efectivos, ya que la infertilidad asociada a la patología no siempre es revertida y además son habituales los casos de recidivas luego de la medicación supresora o de la terapia quirúrgica.

Dada esta situación, es constante la búsqueda de nuevos medicamentos que actúen en forma más directa y más eficaz sobre los implantes en sí, que inhiban los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la enfermedad y que, potencialmente, sean más eficaces en su acción de erradicar las lesiones endometriósicas con menores efectos colaterales.

En los últimos años, nos propusimos encarar la evaluación in vivo de nuevas posibles terapias para la endometriosis. Para ello decidimos ensayar un modelo murino que se basa en el trasplante autólogo de tejido endometrial en un sitio ectópico. Este modelo (que describimos en *Materiales y métodos*) se ha empleado en los distintos estudios que se detallan más adelante.

Hace algunos años se han descrito una serie de mecanismos interrelacionados que actúan a nivel del endometrio ectópico en pacientes con endometriosis y que finaliza con una producción estrogénica local incre-

mentada^{4,5}. Se ha propuesto que el tejido endometriósico responde no solamente a los estrógenos sistémicos, sino también a los producidos en forma autocrina por aumento de expresión y actividad de la aromatasa P450 a nivel local⁶. La aromatasa P450 es la enzima esencial en la biosíntesis de estrógenos, que convierte los andrógenos, androstenediona y testosterona, en estrona y estradiol respectivamente, hormonas fundamentales para el establecimiento y desarrollo de la endometriosis. Asimismo, se conoce una demostrada interacción entre la aromatasa y la cascada prostaglandínica en las lesiones endometriósicas; los estrógenos estimulan la COX-2 y, por lo tanto, incrementan la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), reconocido mediador del proceso inflamatorio. A su vez la PGE₂ estimula la acción de la aromatasa y la secreción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y los estrógenos también inducen la liberación del factor proangiogénico VEGF en células endometriósicas. Estos efectos cierran un círculo vicioso perjudicial, productor de estrógenos a nivel de las lesiones, que se vería agravado por una demostrada deficiencia de 17β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo II (17β HSD tipo II), enzima responsable de convertir el estradiol a estrona (un estrógeno significativamente menos activo)⁷⁻⁹ (Figura 1).

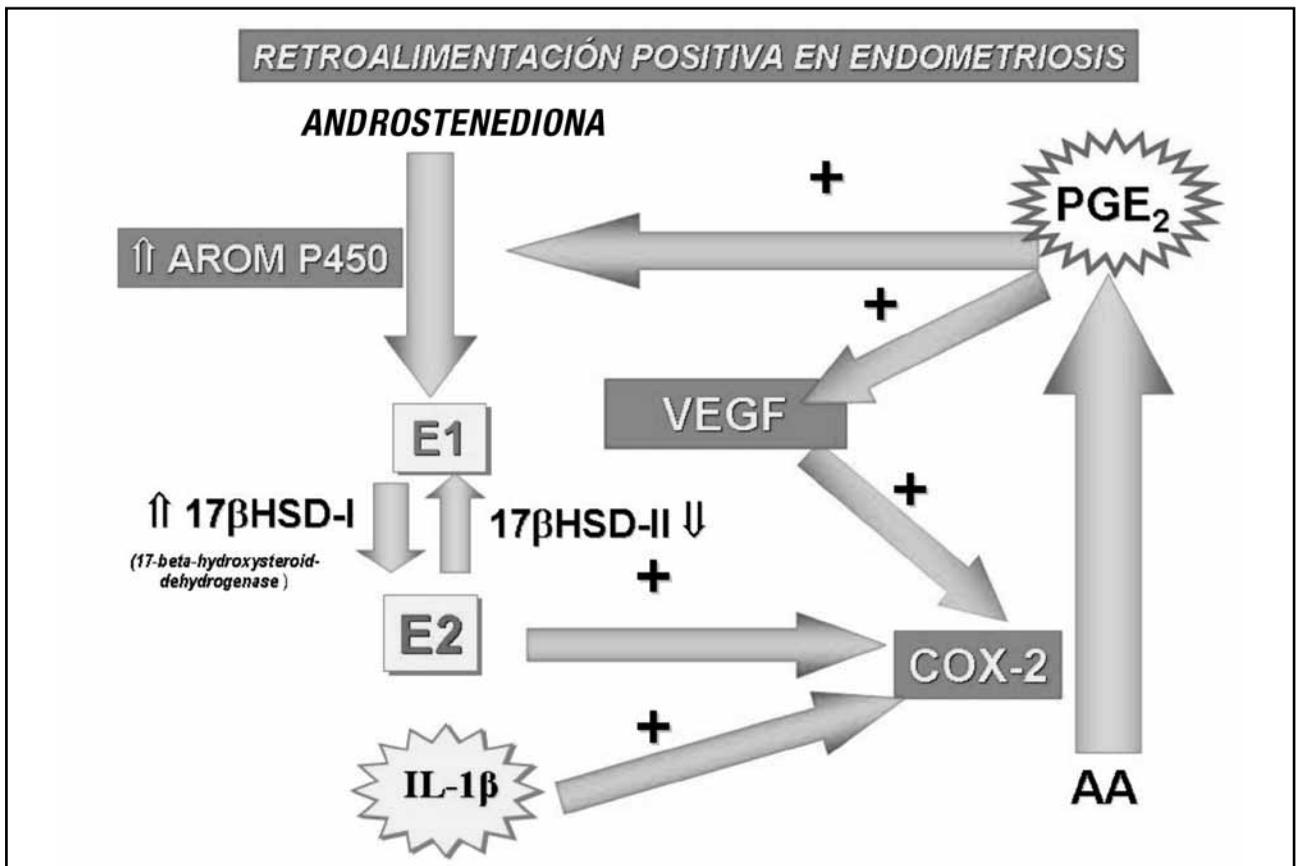


Figura 1. Modelo de retroalimentación positiva en endometriosis.

La combinación de estas dos anomalías: la aumentada expresión de la aromatasa y la deficiencia relativa de la 17 β HSD tipo II contribuyen a mantener altos niveles de estrógenos potentes a nivel de las lesiones endometriósicas¹⁰. De esta manera, se genera una regulación positiva que conlleva a la inflamación local, proliferación celular y angiogénesis de las lesiones endometriósicas. Por lo tanto, la expresión de la aromatasa en el endometrio eutópico, así como también en los implantes endometriósicos, podría ser de fundamental importancia en el desarrollo y progreso de la endometriosis.

La aplicación clínica de los denominados inhibidores de la aromatasa se ha focalizado fundamentalmente en el tratamiento adyuvante en el cáncer de mama¹¹. Su posible aplicación en la terapéutica de la endometriosis fue inicialmente descrita por Takayama y cols.¹², quienes reportaron el uso del inhibidor de la aromatasa anastrozole para tratar a una paciente posmenopáusica con una masa endometriósica pelviana (luego de una histerectomía y anexectomía bilateral) y en la que, previamente, habían fallado otros tratamientos médicos para tratar la endometriosis. Dado que la fuente de estrógenos, en este tipo de pacientes, es extragonadal por aromatización de andrógenos a estrógenos, los inhibidores de la aromatasa actuando a nivel periférico causaron un efecto beneficioso sobre la reducción de las lesiones endometriósicas. Más recientemente, Ailawadi y cols.¹³ reportaron el uso exitoso de una combinación de letrozole con acetato de noretindrona en un pequeño grupo de pacientes con endometriosis.

De nuestros estudios con respecto a la expresión de la aromatasa en pacientes con endometriosis, observamos que existe expresión de la enzima aromatasa P450 en las lesiones endometriósicas peritoneales rojas y negras. Por lo tanto, la actividad de esta enzima favorecería la creación de un ambiente hiperestrogénico que permitiría mayor desarrollo y expansión de la enfermedad¹⁴. Además se conoce que la expresión de la aromatasa está incrementada en el tejido endometrial eutópico de pacientes con endometriosis con respecto a las mujeres controles. Asimismo, en los estudios in vitro observamos que los inhibidores de esta enzima (letrozole y anastrozole) producen un efecto beneficioso induciendo una significativa disminución de la proliferación celular y un aumento en la apoptosis de las células endometriales de pacientes con endometriosis¹⁵. Basándonos en estos conocimientos, nos propusimos nuestro **primer objetivo, que fue la evaluación in vivo del tratamiento con inhibidores de la enzima aromatasa sobre el desarrollo de las lesiones y el ambiente peritoneal.**

Por otro lado, el inhibidor selectivo de la COX-2, celecoxib, está siendo últimamente evaluado por sus efectos inhibitorios de la progresión tumoral. Específicamente, se han descrito efectos antiangiogénicos (inhibe la secreción de VEGF), antiproliferativos y proapoptóticos tanto in vitro, in vivo, como en ensayos clínicos actualmente en curso¹⁶⁻¹⁸. Más aún, en estudios recientes se ha demostrado que el celecoxib inhibe el crecimiento tumoral induciendo la apoptosis de manera independiente de su capacidad para bloquear la COX-2^{17,19,20}. Recientemente, Basu y cols. describieron los mecanismos moleculares implicados en la inducción de la apoptosis por parte del celecoxib en una línea celular de cáncer de mama¹⁶. Sin embargo, a pesar de que el celecoxib se utiliza como potente antiinflamatorio en algunas pacientes con endometriosis, ningún estudio ha evaluado hasta el momento su efecto sobre el crecimiento y la apoptosis del tejido endometrial eutópico o ectópico.

En nuestros estudios realizados in vitro en cultivos de células de epitelio endometrial de pacientes con endometriosis, hemos comprobado que el tratamiento con celecoxib fue eficaz para inhibir la proliferación celular, aumentar la apoptosis e inhibir la secreción de las moléculas inflamatorias y proangiogénicas PGE₂ y VEGF²¹ in vivo. Los receptores activados por el proliferador del peroxisoma (PPAR) son una familia de receptores nucleares que responden a ligandos endógenos (ácidos grasos libres y eicosanoides) y a compuestos químicos que modulan la transcripción de un gran número de genes. Se han descrito hasta ahora tres clases: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ .

Las tiazolidinedionas o glitazonas son fármacos hipoglucemiantes que originalmente fueron desarrollados como hipolipidemiantes y actúan uniéndose al PPAR γ . Los inhibidores de la COX-2 y los agonistas del PPAR γ han demostrado poseer efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapoptóticos en modelos de cáncer tanto in vivo como in vitro. Basándonos en estos antecedentes, **el segundo objetivo fue evaluar el efecto del celecoxib y la rosiglitazona en un modelo de endometriosis en ratón.**

Es un hecho conocido que en cualquier tejido u órgano autotrasplantado es imprescindible una adecuada irrigación sanguínea para que pueda sobrevivir. Por este motivo, en los últimos años comenzó a cobrar mayor importancia la posibilidad de la regulación de la angiogénesis en endometriosis, ya que ésta podría ser una nueva opción terapéutica para esta patología.

Se ha observado que las lesiones endometriósicas son hipervascularizadas^{22,23}. Se ha reportado que

distintas citoquinas, factores de crecimiento, hormonas esteroideas y eicosanoides participan de la angiogénesis en endometriosis²⁴. Uno de los principales factores involucrados en la neovascularización del tejido endometrial ectópico es el VEGF, el cual no sólo sería producido por el mismo tejido endometrial, sino también por los macrófagos peritoneales. Por otra parte, la secreción de este factor angiogénico sería estimulada por los esteroides ováricos, particularmente por el aumento de estradiol.

El VEGF pertenece a una familia de proteínas que están involucradas tanto en la angiogénesis fisiológica como en varias condiciones patológicas que se caracterizan por una excesiva vascularización²⁵⁻²⁷.

Se sabe que los niveles de VEGF en el líquido peritoneal y en las lesiones de pacientes con endometriosis están aumentados con respecto a los controles. Estudios de nuestro laboratorio indican que el VEGF y la IL-1 β favorecerían la sobrevida del endometrio ectópico de pacientes con endometriosis²⁸.

El VEGF es producido por células endometrióticas y macrófagos peritoneales y sería uno de los factores decisivos en el origen y desarrollo de esta patología. En el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis se han encontrado altas concentraciones de VEGF-A, con niveles más elevados durante la fase proliferativa del ciclo menstrual²⁹. Se ha reportado también que la severidad de la enfermedad tiene una correlación positiva con la concentración del VEGF-A en el fluido peritoneal³⁰.

El bevacizumab es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado recombinante, que se une al VEGF e inhibe su actividad biológica. Es un antiangiogénico que se utiliza junto al 5-fluorouracilo en el tratamiento de diversos tumores, tales como el colorrectal, el pulmonar y más recientemente, el mamario. Por lo tanto, **nuestro tercer objetivo fue evaluar el efecto del tratamiento in vivo con bevacizumab sobre el desarrollo de las lesiones y el ambiente peritoneal.**

Materiales y métodos

Animales y tratamientos: se utilizaron ratones hembra vírgenes Balb/c de 2 meses de edad del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental con alimento y agua a voluntad, bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de 20 \pm 2 °C y humedad constante. Todos los estudios con animales se realizaron según las normas internacionales estipuladas en la "Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio" (*Institute of Laboratory Animal Resources*, 1996).

A todos los animales se les realizó el trasplante de fragmentos de uno de los cuernos uterinos al mesenterio del intestino como se ha descrito previamente³¹. Brevemente, los animales se anestesiaron por vía intra-

peritoneal con ketamina (100 mg/kg peso)/xilacina (10 mg/kg peso) y se les realizó una incisión medioventral para exponer el útero y los intestinos. Se ligó el cuerno uterino derecho en ambos extremos, se lo retiró y colocó en medio estéril DMEM-F-12 (Gibco). Posteriormente se lo abrió longitudinalmente y se cortaron fragmentos de aproximadamente 4 mm². Se suturaron al mesenterio del intestino la misma cantidad de fragmentos en todos los animales de la serie (dos o tres según el experimento) y se cerró el abdomen.

Tratamiento con inhibidores de la aromataza: los ratones se dividieron en tres grupos experimentales (n=12, c/u): anastrozole, letrozole y control. A cada animal se le suministró una inyección subcutánea diaria de anastrozole (10 μ g/día equivalente a 0,5 mg/kg), letrozole (10 μ g/día equivalente a 0,5 mg/kg) o solución salina respectivamente. Todos los tratamientos se realizaron durante 4 semanas y los ratones fueron monitoreados diariamente. No se encontraron evidencias de toxicidad con las dosis administradas basándonos en el peso corporal, el consumo de comida, el comportamiento y los niveles de actividad comparados con los controles. El tratamiento se inició en el día posoperatorio 1 para determinar los efectos de los inhibidores de la aromataza en el establecimiento y progresión de la enfermedad. En los estudios para determinar los efectos sobre las lesiones establecidas, el tratamiento con los inhibidores de la aromataza comenzó en el día posoperatorio 28 y continuó durante 4 semanas.

Tratamiento con inhibidores de la COX-2 y agonistas de receptores PPAR γ : se emplearon 48 animales divididos en cuatro grupos de tratamiento diferentes (n=12 c/u): control: recibieron 100 μ l de agua destilada con 0,5% de carboximetilcelulosa (CMC); celecoxib: recibieron 200 mg/kg de celecoxib (reconstituido en agua destilada con el 0,5% CMC); rosiglitazona: recibieron 0,16 mg/kg de rosiglitazona (reconstituido en agua destilada) y celecoxib + rosiglitazona, que recibieron los fármacos combinados. Todos los tratamientos fueron administrados diariamente por sonda esofágica, que comenzó en el día posoperatorio 1 y continuó durante 28 días.

Tratamiento con bevacizumab: a los 15 días de inducida la endometriosis se comenzó con el tratamiento que consistió en una inyección intraperitoneal (i.p.) cada 3 días de 5 mg/kg de bevacizumab en solución fisiológica (s.f.). El grupo control recibió inyecciones de s.f. bajo el mismo patrón.

Luego de finalizar los tratamientos respectivos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se abrió la cavidad abdominal, se contó el número de lesiones desarrolladas y se midieron los diámetros mayor

y menor de cada lesión con un calibre determinándose los radios mayor (R) y menor (r). El tamaño de la lesión se calculó utilizando la siguiente fórmula $V=4/3.\pi.r^2.R^{32}$. Seguidamente, se extrajeron las lesiones y se fijaron en paraformaldehído al 10%. El tejido ectópico fijado se incluyó en parafina y se realizaron cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los cortes se examinaron histológicamente para confirmar la presencia de tejido endometrial.

Proliferación celular: para evaluar la proliferación celular, se analizó la expresión del PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) en cortes de endometrio ectópico mediante la técnica de inmunohistoquímica. El PCNA, también llamado ciclina, es una proteína auxiliar de la ADN polimerasa δ de 36 KD que se usa como marcador de proliferación celular debido a que su expresión se correlaciona con el estado proliferativo de la célula³³.

Apoptosis: para la cuantificación de la apoptosis, se utilizaron cortes seriados de tejido ectópico provenientes de las mismas muestras embebidas en parafina que se utilizaron para cuantificar la proliferación celular. Dichos cortes se sometieron a la técnica de TUNEL utilizando el kit de detección de apoptosis Apoptag Plus (Chemicon International, Temecula CA, USA) que se fundamenta en la localización y marcación de los extremos 3'-OH que se generan por la fragmentación del ADN en las células apoptóticas³⁴.

Densidad vascular: se calculó mediante inmunohistoquímica para el marcador CD34. Se calculó mediante el análisis de 10 campos representativos de cada lesión, el porcentaje de la superficie total que expresaba inmunoreactividad para CD34.

Concentración de VEGF: el líquido peritoneal se colectó por lavado de la cavidad abdominal con 1 ml de solución salina y se evaluó la concentración de VEGF utilizando un kit comercial de ELISA (R&D Systems Inc.). El nivel de sensibilidad fue de 3 pg/ml La variabilidad intraensayo fue de $\pm 4,3\%$ mientras que la interensayo fue $\pm 5,7\%$. Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

Concentración de PGE: los niveles de PGE en el líquido peritoneal fueron evaluados por RIA según la técnica descrita por Luchetti y cols.³⁵. El líquido peritoneal se colectó por lavado de la cavidad abdominal con 1ml de solución salina, se acidificó a pH 3 con 1 ml de HCl y se extrajo tres veces con un volumen de etil acetato para la determinación de PGE. Los extractos se evaporaron hasta el secado bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente y los residuos se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Los niveles de PGE fueron cuantificados utilizando un anticuerpo de conejo anti-PGE (Sigma). La sensibilidad fue de 10 pg/tubo y la reacción cruzada con otras prostaglandinas fue $<0,1\%$. Los resultados se expresaron como pg/ml.

Análisis estadístico: de acuerdo con la distribución de los datos para 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 Tukey. Los resultados se expresaron como mediana \pm SEM. Se consideraron estadísticamente significativos solamente aquellos valores cuyo $p \leq 0,05$.

Resultados

Tratamiento con inhibidores de la aromataasa

El efecto del anastrozole y del letrozole sobre las lesiones endometriósicas se evaluó en dos etapas de su desarrollo: 1) sobre el establecimiento de la lesión (iniciando el tratamiento en el día posoperatorio 1); y 2) sobre la lesión ya establecida (iniciando el tratamiento el día posoperatorio 28). El porcentaje de ratones que desarrollaron endometriosis y el número de lesiones encontradas por ratón fue similar en todos los grupos en cualquiera de los esquemas de tratamiento utilizados. Sin embargo, cuando se evaluó el tamaño de las lesiones, se vio que el tratamiento con los dos inhibidores de la aromataasa causó una disminución significativa de su tamaño, comparadas con el grupo control, en cualquiera de los esquemas de tratamiento utilizados. Cuando se inició el tratamiento en el día posoperatorio 1, el tamaño de las lesiones endometriósicas fue de $43,0 \pm 7,1 \text{ mm}^3$ en el grupo control; de $8,3 \pm 1,4 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con anastrozole ($p < 0,05$ vs. control); y de $3,3 \pm 0,6 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con letrozole ($p < 0,001$ vs. control) (Figura 2 A). Cuando el tratamiento se inició en el día posoperatorio 28, el tamaño de las lesiones endometriósicas fue de $321,0 \pm 66,4 \text{ mm}^3$ en el grupo control, mientras que en el grupo tratado con anastrozole fue de $112,7 \pm 34,6 \text{ mm}^3$ y en el grupo tratado con letrozole fue de $82,0 \pm 21,4 \text{ mm}^3$ ($p < 0,05$ vs. control) (Figura 2B).

El tratamiento con anastrozole y con letrozole provocó una disminución en los niveles de proliferación celular de las lesiones endometriósicas comparado con el grupo control en los dos esquemas de tratamiento utilizados ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ vs. control, respectivamente) (Figura 2C y D).

Complementariamente a lo observado con relación a la proliferación celular, cuando se trató a los ratones a partir del día posoperatorio 1, se observó que el tratamiento con los dos inhibidores de la aromataasa provocó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas comparado con el grupo control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ vs. control para las tratadas con anastrozole y letrozole) (Figura 3A). Cuando el tratamiento se inició en el día 28 posoperatorio,

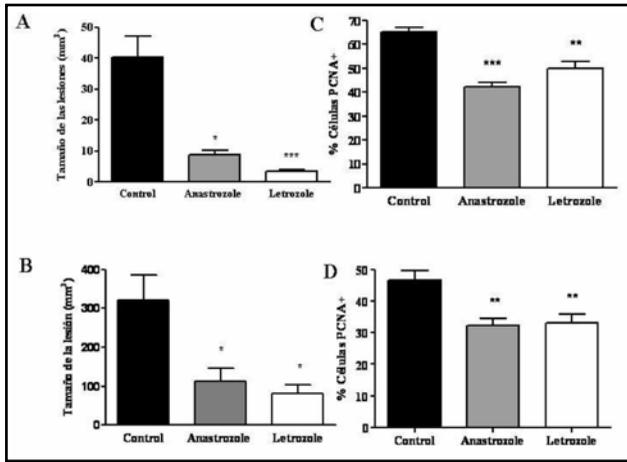


Figura 2. Efecto del tratamiento con inhibidores de la aromatasa sobre el tamaño de las lesiones y la proliferación celular: el tratamiento con los dos inhibidores de la aromatasa causó una disminución significativa del tamaño de las lesiones tanto cuando se inició el tratamiento en el día posoperatorio 1 (anastrozole * $p < 0,05$ vs. control y letrozole *** $p < 0,001$ vs. control) (A) como cuando el tratamiento se inició en el día posoperatorio 28 (* $p < 0,05$ vs. control) (B). Asimismo el tratamiento con anastrozole y con letrozole provocó una disminución en los niveles de proliferación celular de las lesiones en los dos esquemas de tratamientos utilizados (** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ vs. control respectivamente) (C y D).

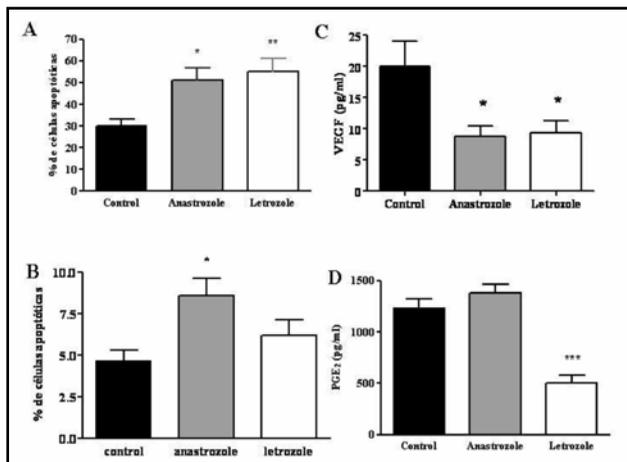


Figura 3. Efecto del tratamiento con inhibidores de la aromatasa sobre la apoptosis, los niveles de VEGF y de PGE: los inhibidores de la aromatasa provocaron un aumento en el porcentaje de células apoptóticas (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. control para las tratadas con anastrozole y letrozole a partir del día 1 posoperatorio) (A). Cuando el tratamiento se inició en día 28 posoperatorio, sólo se observó un aumento significativo en la apoptosis con el tratamiento con anastrozole (* $p < 0,05$ vs. control) (B). Además, el tratamiento con inhibidores de la aromatasa iniciado en el día posoperatorio 28 redujo los niveles de VEGF en el líquido peritoneal (* $p < 0,05$ vs. control) (C) y sólo se observó una significativa reducción en los niveles de PGE con el tratamiento con letrozole (** $p < 0,001$ vs. control) (D).

sólo se observó un aumento estadísticamente significativo en la apoptosis endometrial ectópica con el tratamiento con anastrozole ($p < 0,05$ vs. control) (Figura 3B).

Además, observamos que el tratamiento con inhibidores de la aromatasa iniciado en el día posoperatorio 28 redujo los niveles de VEGF en el líquido peritoneal ($p < 0,05$ vs. Control) (Figura 3C). Asimismo, el tratamiento con letrozole iniciado en el día posoperatorio 28 redujo los niveles de PGE en el líquido peritoneal ($p < 0,001$ vs. control) mientras que el tratamiento con anastrozole no causó cambios significativos en los niveles de PGE ($p > 0,05$ vs. control) (Figura 3D).

Tratamiento con inhibidores de la COX-2 y agonistas de receptores PPAR γ

El grupo tratado sólo con celecoxib y el grupo que recibió la terapia combinada tuvieron una reducción significativa en el número de lesiones establecidas por animal ($p < 0,05$ vs. grupo control), mientras que en el grupo tratado sólo con rosiglitazona, no se hallaron diferencias significativas en el número de lesiones establecidas en comparación con los controles ($p > 0,05$). Los resultados se muestran en la Figura 4A. En todos los grupos de tratamiento hubo una reducción significativa del tamaño de las lesiones. La Figura 4B muestra que el grupo con tratamiento combinado tiende a una mayor reducción del volumen de las lesiones ($p < 0,001$ vs. grupo control) que cualquiera de los tratamientos solos. Asimismo, todos los tratamientos disminuyeron la proliferación celular en comparación con el grupo control (rosiglitazona y celecoxib + rosiglitazona, $p < 0,001$ vs. control y celecoxib $p < 0,01$ vs. control). Los resultados se muestran en la Figura 4C. El tratamiento combinado tendería a ser ligeramente más eficaz para disminuir la proliferación celular que cualquiera de los fármacos por separado, pero el efecto no fue sinérgico o aditivo.

Además, todos los tratamientos fueron eficaces para aumentar la apoptosis en comparación con el grupo control ($p < 0,05$), como se ve en la Figura 4D.

Tanto el tratamiento con celecoxib como con rosiglitazona produjeron una disminución significativa en la densidad vascular en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) y cuando los tratamientos se administraron en combinación, la reducción de la densidad vascular tendió a ser superior ($p < 0,01$ vs. grupo control) (Figura 4E).

Tratamiento con bevacizumab

Si bien el tratamiento con bevacizumab no modificó el número de lesiones (Figura 5A), esta terapéutica produjo una disminución significativa de su volumen en comparación con los ratones tratados con vehículo ($p < 0,05$ vs. control) (Figura 5B).

El efecto del tratamiento se asoció claramente con una disminución de los niveles de VEGF en el líquido peritoneal (Figura 5C) ($p < 0,05$ vs. control) y una importante disminución en la densidad vascular ($p < 0,001$ vs. control) (Figura 5D).

Además, el tratamiento con bevacizumab provocó una disminución en la proliferación de células epiteliales en comparación con el grupo control (Figura 5E) ($p < 0,01$ vs. control). Complementariamente, este tratamiento indujo un aumento de los índices de apoptosis en las células epiteliales de las lesiones ($p < 0,001$ vs. control) (Figura 5F).

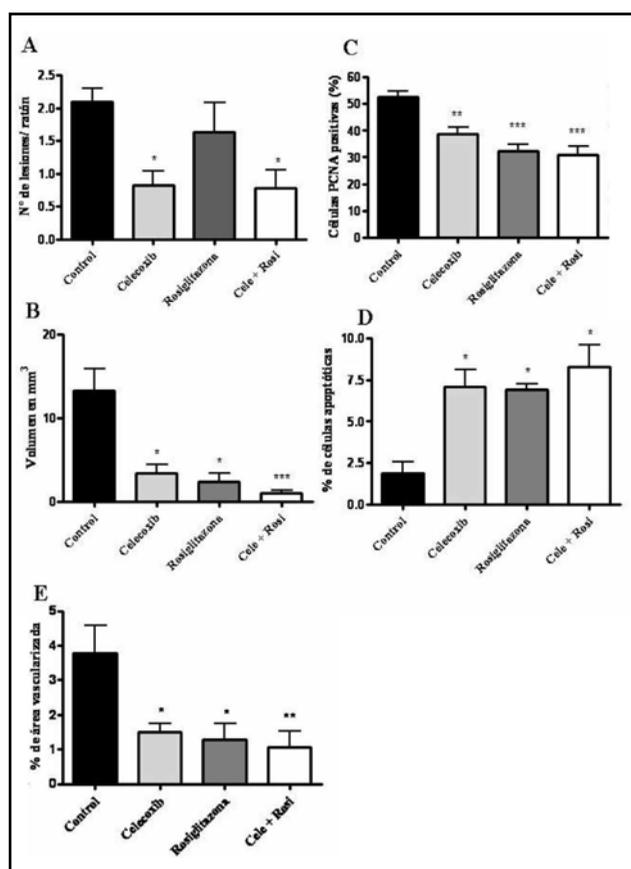


Figura 4. Efecto del tratamiento con inhibidores de la COX-2 y agonistas de receptores PPAR γ : el tratamiento con celecoxib sólo y la terapia combinada produjeron una reducción significativa en el número de lesiones por animal (A) ($*p < 0,05$ vs. control) mientras que en el grupo tratado sólo con rosiglitazona, no se hallaron diferencias significativas con los controles (A). Todos los tratamientos produjeron una reducción significativa del tamaño de las lesiones (B) y fue mayor el efecto del tratamiento combinado (B) ($***p < 0,001$ vs. control). Todos los tratamientos disminuyeron la proliferación celular (rosiglitazona y celecoxib + rosiglitazona, $***p < 0,001$ vs. control y celecoxib $**p < 0,01$ vs. control) (C) y fueron eficaces para aumentar la apoptosis (D) ($*p < 0,05$). Tanto el tratamiento con celecoxib como con rosiglitazona produjeron una disminución significativa en la densidad vascular (E) ($*p < 0,05$) y se observó un mayor efecto con la terapia combinada ($*p < 0,01$ vs. control) (E).

Discusión

Cada vez resulta más evidente la relación existente entre la producción de estrógenos, la angiogénesis y la inflamación en endometriosis³⁶. Los estrógenos, producto de la aromatasa, inducen directamente a la enzima COX-2³⁷ mientras que PGE₂, producto de la COX-2, ha demostrado ser un fuerte inductor de la expresión de la aromatasa en las células endometrióticas⁵. Asimismo, se sabe que el VEGF y la IL-1 β son potentes inductores de COX-2 en las células estromales endometriales y en las células endoteliales^{38,39}. Todos estos mecanismos constituyen un circuito de retroalimentación positiva tendiente a la producción local de estrógenos, a la proliferación celular y a la angiogénesis en las lesiones endometrióticas.

Basándonos en este esquema de retroalimentación positiva (Figura 1), decidimos ensayar en un modelo experimental murino tratamientos tendientes a inhibir distintas etapas de este proceso como posibles alternativas terapéuticas para la endometriosis.

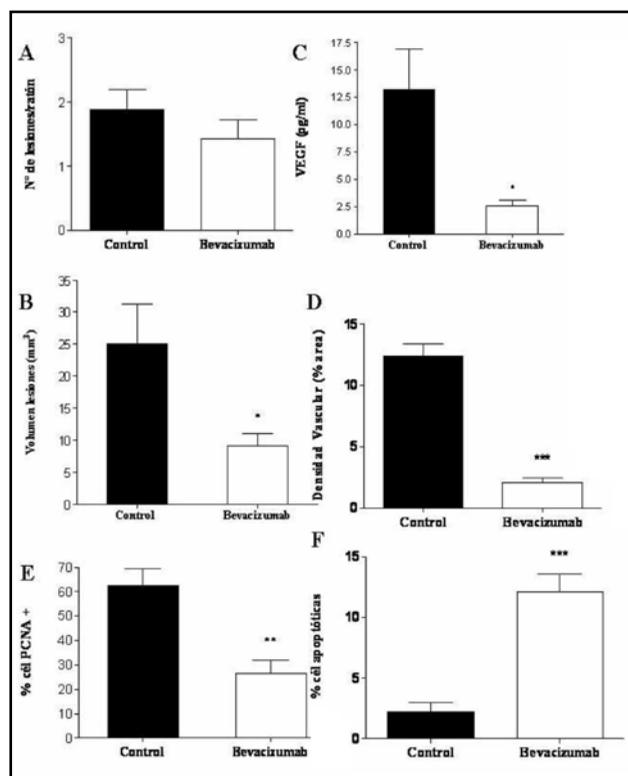


Figura 5. Efecto del tratamiento in vivo con bevacizumab sobre el desarrollo de las lesiones y el ambiente peritoneal: el tratamiento con bevacizumab no modificó el número de lesiones (A), sin embargo, disminuyó significativamente su volumen (B) ($*p < 0,05$ vs. control), los niveles de VEGF (C) ($*p < 0,05$ vs. control), la densidad vascular (D) ($***p < 0,001$ vs. control) y la proliferación celular (E) ($**p < 0,01$ vs. control). Al mismo tiempo, se observó un aumento de la apoptosis en las células epiteliales de las lesiones (F) ($***p < 0,001$ vs. control).

Comenzamos evaluando el efecto del tratamiento con dos inhibidores de la aromatasa, letrozole y anastrozole, sobre el establecimiento de las lesiones endometriósicas (iniciando el tratamiento en el día posoperatorio 1) y sobre las lesiones ya establecidas (iniciando el tratamiento en el día posoperatorio 28).

Observamos que tanto el tratamiento con letrozole como con anastrozole no impidió el establecimiento de las lesiones endometriósicas ni las erradicó por completo, pero causó una disminución estadísticamente significativa de su tamaño. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fang y cols. quienes demostraron que el letrozole disminuye el tamaño de las lesiones endometriósicas en un modelo murino de endometriosis³¹. Asimismo se han reportado estudios piloto y casos clínicos en los que se ha utilizado el anastrozole^{12,13,40} o el letrozole⁴¹ para tratar la endometriosis en pacientes en quienes se ha observado una disminución en el tamaño de las lesiones endometriósicas luego del tratamiento.

En este trabajo también se observó que los inhibidores de la aromatasa, anastrozole y letrozole, disminuyen la proliferación celular en las lesiones endometriósicas tanto en las lesiones que se están estableciendo como en las ya establecidas. Asimismo el anastrozole provoca un aumento en los niveles de apoptosis en las lesiones que se están estableciendo y en las ya establecidas. En cambio, observamos que el letrozole aumenta el porcentaje de células apoptóticas en las lesiones que se están estableciendo.

Este efecto promotor de la apoptosis y supresor de la proliferación celular que poseen los inhibidores de la aromatasa se ha observado tanto in vivo como in vitro. Fang y cols. demostraron que el tratamiento con letrozole disminuye la proliferación celular en las lesiones endometriósicas en un modelo murino de endometriosis³¹. Asimismo se ha observado que el letrozole disminuye los niveles de proliferación celular en tumores mamarios⁴² y que aumenta los índices de apoptosis en tumores derivados de líneas celulares de cáncer de mama en ratones nude⁴³. Dowsett y cols. demostraron que el tratamiento con anastrozole disminuye la proliferación celular en tumores mamarios humanos, aunque no tiene efecto sobre los niveles de apoptosis⁴⁴. En relación con estos resultados, en nuestro laboratorio hemos probado que tanto el tratamiento con anastrozole como con letrozole in vitro causa una disminución en los niveles de proliferación celular y un aumento en los índices de apoptosis en las células endometriales de pacientes con endometriosis, lo que sugiere un efecto directo de estos compuestos sobre la proliferación celular y apoptosis

del endometrio ectópico¹⁵. Otros autores han observado efectos semejantes en células de leiomiomas uterinos⁴⁵ y en células epiteliales de tumores de mama humanos⁴³ in vitro.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con anastrozole y con letrozole provoca una disminución en la concentración de VEGF en el líquido peritoneal. Sin embargo, solamente el tratamiento con letrozole disminuye la concentración de PGE en el líquido peritoneal, ya que el tratamiento con anastrozole no tuvo efecto. En coincidencia con estos resultados, Bottini y cols. demostraron que el tratamiento con letrozole en pacientes con cáncer de mama disminuye la expresión de VEGF en los tumores⁴⁶, mientras que Weems y cols. observaron que el tratamiento con inhibidores de la aromatasa disminuye los niveles plasmáticos de PGE₂ en ovejas preñadas de 90 días y ovariectomizadas⁴⁷. Esta diferencia podría explicarse sobre la base de los trabajos de otros autores que han observado que el letrozole es más potente que el anastrozole tanto in vivo como in vitro⁴⁸. Asimismo se ha probado que existen diferencias entre estos dos inhibidores en términos de farmacocinética y en cuanto a su efecto sobre los lípidos plasmáticos, el hueso y la esteroideogénesis en la glándula adrenal⁴⁹, lo que sugiere que estos compuestos poseerían efectos diferenciales.

En este trabajo utilizamos una dosis de letrozole y anastrozole de 10 µg por día por ratón, administrada por vía subcutánea. Si bien estas dosis son un orden mayor a las utilizadas para tratar la endometriosis en pacientes^{13,41}, ya fueron usadas previamente por otros autores en modelos de endometriosis en ratón³¹ y de cáncer de mama en ratones nude^{50,51}. Además se debe tener en cuenta que, si bien las dosis de inhibidores de la aromatasa utilizadas para tratar la endometriosis son menores a las usadas en este estudio, cuando se emplean estos compuestos en pacientes premenopáusicas siempre se lo hace en combinación con otros agentes, como los progestágenos, los anticonceptivos orales combinados y los agonistas de GnRH^{13,40,52}.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los inhibidores de la aromatasa tendrían un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las lesiones endometriósicas, regulando los niveles de apoptosis y proliferación celular en ellas, y sobre el ambiente peritoneal, provocando la disminución de los niveles de PGE y VEGF. Asimismo, estos resultados refuerzan la idea de que la inhibición de la aromatasa sería una estrategia atractiva para continuar investigando en endometriosis.

Posteriormente, quisimos evaluar el efecto de la inhibición de la enzima COX-2. Para ello empleamos un inhibidor selectivo de esta enzima, el celecoxib.

Observamos que el tratamiento con celecoxib inhibe el establecimiento y el crecimiento de las lesiones endometriósicas. Comprobamos que, además, disminuyó la proliferación celular así como la densidad vascular y aumentó la apoptosis dentro de las lesiones.

Los inhibidores selectivos de la COX-2 modernos aún no han sido aprobados para la endometriosis. Sin embargo, un prometedor primer estudio controlado con placebo, doble ciego, demostró que el uso de un inhibidor de COX-2 es una terapéutica segura y económica para el dolor pelviano asociado a la endometriosis⁵³.

En el presente trabajo, también encontramos que el tratamiento con rosiglitazona inhibió el crecimiento de implantes endometriósicos. Por otra parte, se estudiaron los niveles de apoptosis y proliferación celular en las lesiones endometriósicas y se observó que después de este tratamiento aumentó la apoptosis y se inhibió la proliferación celular.

En la endometriosis, los ligandos PPAR γ también se han utilizado con resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo*. Lebovic y cols. estudiaron los efectos de la ciglitazona en un modelo de endometriosis en rata y observaron reducción en el tamaño de las lesiones de endometriosis inducidas experimentalmente⁵⁴. Otros autores demostraron que el tratamiento con rosiglitazona fue eficaz para reducir el crecimiento de tejido endometriósico y provocó la regresión de los implantes en un modelo animal similar^{55,56}. Más recientemente, en un estudio realizado en primates, se evaluaron los efectos de la rosiglitazona en comparación con un antagonista de GnRH y se observó que sólo las glitazonas provocaron la regresión de los implantes⁵⁷.

No existen datos previos de utilización de una terapia combinada PPAR γ y COX-2 en un modelo *in vivo* de endometriosis. Aquí hemos observado que el tratamiento combinado fue eficaz para reducir el tamaño, la proliferación celular y la densidad vascular, así como para aumentar la apoptosis en las lesiones endometriósicas. Además, el tratamiento combinado (inhibidor de COX-2 + la activación de PPAR γ) fue mejor que cualquiera de estos tratamientos por separado.

Los resultados presentados en este trabajo son prometedores y es un hecho alentador que los fármacos utilizados en este estudio, ya sea combinados o por separado, que se emplean en la actualidad para el tratamiento de otras enfermedades, puedan ser adecuados para el tratamiento de la endometriosis.

Finalmente, quisimos confirmar si el mantenimiento y el crecimiento de las lesiones endometriósicas dependían de la angiogénesis y si la inhibición de la an-

giogénesis podría ser una aproximación terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad. Para ello, evaluamos el efecto de una terapia antiangiogénica con bevacizumab durante el desarrollo de lesiones de endometriosis establecidas.

Se observó que el tratamiento con bevacizumab redujo el tamaño de las lesiones endometriósicas mediante la disminución de la proliferación celular y el incremento de los niveles de apoptosis. Además hemos demostrado que este tratamiento produjo una disminución de la densidad vascular en las lesiones y, por consiguiente, se redujeron los niveles de VEGF en el líquido peritoneal.

Hasta el momento, no hemos observado que el uso de bevacizumab tuviera un efecto significativo en la reducción del número de lesiones endometriósicas del ratón. Sin embargo, en un modelo de endometriosis en ratones nude, Nap y cols. encontraron que algunos agentes angiostáticos redujeron significativamente el número de lesiones por ratón⁵⁸, a pesar de que habían iniciado el tratamiento tres semanas después de la cirugía.

Por otra parte, Laschke y cols. demostraron *in vivo* que la vascularización de las lesiones endometriósicas en hámsters disminuyó significativamente por la inhibición combinada de VEGF, FGF y PDGF, pero no con el antagonista de VEGF solo⁵⁹ y tampoco observaron una reducción significativa del tamaño de las lesiones con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, en nuestro modelo, encontramos que no sólo la vascularización de las lesiones endometriósicas fue significativamente más baja, sino que también su tamaño se redujo significativamente.

La capacidad del Avastin® para inhibir la angiogénesis se ha evaluado con éxito en pacientes oncológicos^{60,61}. Sin embargo, a pesar de la probada eficacia del bevacizumab, es importante considerar los posibles efectos secundarios adversos de esta droga, como la proteinuria, hipertensión, epistaxis o hemorragia⁶², por lo que podría ser un tratamiento demasiado cruento para mujeres con endometriosis.

Nuestro trabajo confirma que la angiogénesis es un requisito previo para el mantenimiento y crecimiento de la endometriosis y que la terapia antiangiogénica es efectiva para inhibir las lesiones endometriósicas establecidas. Tomando los resultados obtenidos y los datos bibliográficos, creemos que la inhibición angiogénica podría constituirse como otra terapia prometedora para la endometriosis.

En conclusión, en el presente trabajo hemos evaluado distintas alternativas terapéuticas en un modelo murino de endometriosis basándonos en los nuevos conocimientos acerca de la fisiopatología de la enfermedad. Estos nuevos blancos terapéuticos: la aromatasa

P450, la enzima COX-2 y el VEGF, parecen ser promotores y atractivos a la hora de diseñar nuevos compuestos para el tratamiento de la endometriosis. Nuestros resultados inhibiendo la producción local de estrógenos, la producción de prostaglandinas y la angiogénesis de la lesión endometriósica son prometedores, ya que en todos los casos hemos demostrado una inhibición del desarrollo de la enfermedad. Consideramos importante continuar estudiando y aportando desde la ciencia básica a mejorar la terapéutica que se les ofrece a las pacientes con endometriosis.

Referencias

1. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364:1789-99.
2. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24:235-58.
3. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-69.
4. Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J, Sebastian S. Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 79:19-25.
5. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, Agarwal VR, Zhao Y, Carr BR, Bulun SE. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:600-6.
6. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, Tamura M, Sebastian S, Zhou J, Amin S, Yang S. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002; 55:21-33.
7. Attar E, Bulun SE. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril* 2006; 85:1307-18.
8. Jabbour HN, Sales KJ, Smith OP, Battersby S, Boddy SC. Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 252:191-200.
9. Albrecht ED, Babischkin JS, Lidor Y, Anderson LD, Udoff LC, Pepe GJ. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 2003; 18:2039-47.
10. Bulun SE, Fang Z, Imir G, Gurates B, Tamura M, Uilmaz MB, Langoi D, Amin D, Yang S, Deb S. Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2004; 22:45-50.
11. Dixon JM, Bundred N. Aromatase inhibitors for early breast cancer therapy: a choice of effective treatment strategies. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32:123-5.
12. Takayama K, Zeitoun K, Gunby RT, Sasano H, Carr BR, Bulun SE. Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 1998; 69:709-13.
13. Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, Bulun SE. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004; 81:290-6.
14. Bilotas MA, Augé L, Belló A, Barañao RI. Expresión de aromatasa P450 en lesiones endometriósicas peritoneales (LEP). *Medicina (Bs. As.)* 2004; 64:299.
15. Meresman GF, Bilotas M, Abello V, Buquet R, Tesone M, Sueldo C. Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84:459-63.
16. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. 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.
17. Jendrossek V, Handrick R, Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 2003; 17:1547-9.
18. Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Dallel R, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004; 82:1609-15.
19. Lai GH, Zhang Z, Sirica AE. 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; 2:265-71.
20. Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:736-47.
21. Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesore M, Meresman G. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008; 23:2701-8.
22. Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59:681-4.
23. Matsuzaki S, Canis M, Murakami T, Dechelotte P, Bruhat MA, Okamura K. Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:712-6.
24. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955:89-100.
25. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Stearns ME, Holland JF, Claffey K, Levine AC. 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; 17:687-94.
26. Collins TS, Hurwitz HI. Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005; 32:61-8.
 27. Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 2002; 123:379-87.
 28. Bilotas M, Meresman G, Buquet R, Sueldo C, Baranao RI. Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *J Reprod Immunol* 2010; 84:193-8.
 29. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000; 6:45-55.
 30. Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:177-200.
 31. Fang Z, Yang S, Gurates B, Tamura M, Bulun SE, Zin Z, Imin G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R. Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3460-6.
 32. Lee C. Levels of cyclic nucleotides in autotransplanted 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors during their growth and regression. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:1029-32.
 33. Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987; 105:1549-54.
 34. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.
 35. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, González C, Di Girolano G, Chiochio S, Cremaschi G, Motta AB. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol* 2004; 64:59-74.
 36. Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 2006; 12:49-56.
 37. Tamura M, Deb S, Sebastian S, Okamura K, Bulun SE. Estrogen up-regulates cyclooxygenase-2 via estrogen receptor in human uterine microvascular endothelial cells. *Fertil Steril* 2004; 81:1351-6.
 38. Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Bulun SE. Interleukin-1beta elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3263-73.
 39. Tamura M, Sebastian S, Gurates B, Yang S, Fang Z, Bulun SE. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3504-7.
 40. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84:300-4.
 41. Heffler LA, Grimm C, van Trotsenburg M, Nagele F. Role of the vaginally administered aromatase inhibitor anastrozole in women with rectovaginal endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2005; 84:1033-6.
 42. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Tao Y, Llombart-Cussac A, Janicke F, Maurinac L, Quebe-Fehling E, Chandri-Ross HA, Evans DB, Miller WR. Letrozole inhibits tumor proliferation more effectively than tamoxifen independent of HER1/2 expression status. *Cancer Res* 2003; 63:6523-31.
 43. Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003; 63:8037-50.
 44. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, Bolddinghaus I, Salter J, Dethre S, Hills M, Ashley S, Francis S, Walsh G, A'hern R. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1024s-30s.
 45. Han M, Kim JY, Park JE, Kim JM, Lee KS. Effects of letrozole on proliferation and apoptosis in cultured leiomyoma cells treated with prostaglandin E(2). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 138:83-8.
 46. Bottini A, Generali D, Brizzi MP, Fox SB, Bersiga A, Bonardi S, Allevi G, Aguggini S, Bodini G, Milani M, Dionisio R, Bernard C, Montruccoli A, Bruzzi P, Havis AL, Dogliotti L, Berrutti A. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:3623-8.
 47. Weems YS, Bridges PJ, LeaMaster BR, Sasser RG, Ching L, Weems CW. Effect of the aromatase inhibitor CGS-16949A on pregnancy and secretion of progesterone, estradiol-17beta, prostaglandins E and F2alpha (PGE; PGF2alpha) and pregnancy specific protein B (PSPB) in 90-day ovariectomized pregnant ewes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001; 66:77-88.
 48. Haynes BP, Dowsett M, Miller WR, Dixon JM, Bhatnagar AS. The pharmacology of letrozole. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 87:35-45.
 49. Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz

- JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. *Cancer* 2002; 95:2006-16.
50. Lu Q, Yue W, Wang J, Liu Y, Long B, Brodie A. The effects of aromatase inhibitors and antiestrogens in the nude mouse model. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 50:63-71.
51. Brodie A, Jelovac D, Long BJ. Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. *Clin Cancer Res* 2003; 9:455S-9S.
52. Remorgida V, Abbamonte HL, Ragni N, Fulcheri E, Ferrero S. Letrozole and norethisterone acetate in rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 2007; 88:724-6.
53. Cobellis L, Razzi S, De Simone S, Santini A, Fave A, Danero S, Gioffree W, Mazzini M, Petraglia F. 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; 116:100-2.
54. Lebovic DI, Kir M, Casey CL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *Fertil Steril* 2004; 82 Suppl 3:1008-13.
55. Aytan H, Caliskan AC, Demirturk F, Aytan P, Ko-seoglu DR. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces the size of experimental endometriosis in the rat model. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2007; 47:321-5.
56. Demirturk F, Aytan H, Caliskan AC, Aytan P, Ko-seoglu DR. 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.
57. Lebovic DI, Mwenda JM, Chai DC, Mueller MD, Santi A, Fisseha S, D'Hooghe T. PPAR-gamma receptor ligand induces regression of endometrial explants in baboons: a prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study. *Fertil Steril* 2007; 88:1108-19.
58. Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, Groothuis PG. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1089-95.
59. Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2006; 21:262-8.
60. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333:328-35.
61. McCarthy M. Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 2003; 361:1959.
62. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:1788-95.