

El tratamiento con inhibidores de aromatasa reduce el tamaño de las lesiones en un modelo de endometriosis murina

Trabajo presentado para optar al premio
"Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva" – Año 2006 –

Mariela Bilotas MSc ¹, Gabriela Meresman PhD ¹, Inés Stella MD ², Carlos Sueldo MD ³ y Rosa Inés Baraño PhD ¹.

1 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) – CONICET

2 Hospital Israelita, Buenos Aires

3 Centro de Ginecología y Reproducción (CEGYR) – Buenos Aires.

Resumen

Antecedentes: La aromatasa P450, es la enzima esencial en la biosíntesis de estrógenos, fundamentales para el establecimiento y crecimiento de la endometriosis (EDT). Ha sido demostrado que el tejido endometrial eutópico y ectópico expresa aromatasa P450, indicando que existiría una fuente de estrógenos extragonadal. De este modo el uso de inhibidores de la aromatasa podría tener un potencial terapéutico en pacientes con endometriosis.

Objetivos: Evaluar el efecto de los inhibidores de aromatasa (Letrozole y Anastrozole) sobre el establecimiento, proliferación y apoptosis del tejido endometrial ectópico "in vivo".

Materiales y Métodos: Se utilizaron 51 ratones hembra Balb/c de 2 meses de edad, que se dividieron en tres grupos: Control (n=19), Anastrozole (n=16) y Letrozole (n=16). A todos los animales se les realizó la cirugía para inducir la formación de lesiones endometriósicas y al día siguiente de la misma se comenzó con el tratamiento. Se les suministró una inyección diaria subcutánea de Anastrozole (10 µg/día),

Letrozole (10 µg/día) o solución salina. Transcurridos 28 días de tratamiento se sacrificaron los animales, se contó el número y se evaluó el tamaño de las lesiones. Luego se extrajeron para su posterior evaluación histológica. La proliferación celular se cuantificó mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo policlonal anti-PCNA. Los porcentajes de células apoptóticas se cuantificaron mediante la técnica de TUNEL. Los resultados se analizaron empleando el test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test de múltiples comparaciones de Dunn.

Resultados: El porcentaje de ratones que desarrollaron EDT y el número de lesiones encontradas por ratón fue similar en todos los grupos. Sin embargo, el tamaño de las lesiones endometriósicas (expresadas como $X \pm SEM$) fue significativamente menor en el grupo tratado con Anastrozole ($p < 0.05$ vs. Control) y en el grupo tratado con Letrozole ($p < 0.001$ vs. Control). En la evaluación de la proliferación celular de las lesiones, se halló que ambos tratamientos produjeron una significativa disminución de la misma,

($p < 0.01$ Control vs Letrozole y $p < 0.001$ Control vs. Anastrozole). La evaluación de la apoptosis reveló un aumento significativo de la misma tanto con el tratamiento con Anastrozole ($p < 0.05$) como con Letrozole ($p < 0.01$).

Conclusiones: Si bien el tratamiento con inhibidores de aromatasa al inicio de la EDT no impidió el desarrollo de las lesiones causó una disminución significativa de su tamaño. Asimismo, tanto el tratamiento con Letrozole como con Anastrozole, disminuyó significativamente la proliferación celular y aumentó la apoptosis.

Introducción

La endometriosis (EDT) se define como “la presencia de tejido, histológicamente similar al endometrio, por fuera del útero”. Es una enfermedad benigna que afecta a un 10 % de mujeres en edad reproductiva; muy especialmente en aquellas consideradas infértiles, donde la incidencia alcanza niveles del 40-50 % (D’Hooghe TM y col., 2004; Seli E y col., 2003). El principal síntoma es el dolor pélvico agudo y/o crónico que puede además asociarse con dismenorrea y dispareunia, todo lo cual suele inhabilitar a las mujeres en su vida social y laboral (Giudice LC y Kao LC, 2004).

Hasta el momento, la manera más certera para diagnosticar EDT es la laparoscopia, que permite además realizar un tratamiento quirúrgico en la misma operación (Crosignani P y col., 2006).

Los tratamientos médicos, se fundamentan en que el endometrio ectópico responde a las hormonas sexuales esteroideas. Por ello estos tratamientos se han basado en alterar el ambiente esteroideo y de esta manera inhibir la proliferación de las lesiones.

En las últimas dos décadas del siglo pasado se popularizó el uso de Danazol como tratamiento médico de la EDT (Remohí J y Levy M, 1995), pero sus efectos colaterales como el incremento en el peso corporal, bochornos, acné, y/o los efectos androgénicos, hicieron de ésta una

alternativa indeseable para la mayoría de las pacientes jóvenes con la enfermedad.

La administración de anticonceptivos orales combinados (Stockwell J, 2006), ya sea en forma cíclica o continua, es un tratamiento empleado especialmente en mujeres jóvenes que no buscan embarazo y/o que padecen de grados variables de dismenorrea.

Más recientemente, los agonistas de GnRH, se han constituido en la otra opción terapéutica médica ya que generan hipostrogenismo a través de la supresión hipofisaria y secundariamente gonadal, lo que lleva a la atrofia de los implantes endometriósicos peritoneales. No obstante este tratamiento no ha sido eficaz para algunas pacientes peri o postmenopáusicas con EDT y dolor pélvico, ya que en estos casos el mantenimiento de los implantes endometriósicos estaría basado en un mecanismo extragonadal de producción estrogénica, diferente de la síntesis de estrógenos ovárica (Crosignani P y col., 2006; Ferrero S y col., 2005).

En 1996 el grupo dirigido por Bulun publicó que existía presencia de la enzima aromatasa P450 en endometrio ectópico y eutópico de pacientes con EDT, a diferencia del tejido endometrial normal de las mujeres sin EDT (Noble LS y col., 1996). La aromatasa P450, es la enzima esencial en la biosíntesis de estrógeno, convirtiendo los andrógenos, androstenediona y testosterona, en estrona y estradiol respectivamente, elementos fundamentales para el establecimiento y crecimiento de la EDT (Bulun SE y col., 2001). Dichos autores postularon entonces que en EDT existiría una producción estrogénica local incrementada y que el tejido endometriósico respondería no solamente a los estrógenos sistémicos, sino también a los localmente producidos (efecto autocrino), (Bulun SE y col., 2002).

Por otra parte, esta diferencia fundamental entre el endometrio eutópico normal y el de pacientes con EDT, podría ser empleada como un método diagnóstico ya que sólo se requeriría una biopsia endometrial (Bulun SE y col., 2001).

Sin embargo en 1982, Tseng y col. (Tseng L y col., 1982) habían publicado que el endometrio humano normal es capaz de sintetizar estrógenos a partir de testosterona y androstenediona, en concentraciones similares a las plasmáticas. Además la mayor capacidad de aromatización se hallaba en la fracción estromal en la fase proliferativa y luego en la fase secretoria, mientras que la fracción epitelial presentaba una actividad significativamente inferior en las mismas fases (Tseng L, 1984). La presencia de aromatasas P450 en útero humano normal también fue confirmada por otros autores tanto por su actividad (Taga S y col., 1990) como por la expresión de su ARNm (Brosens J y col., 2004; Dheenadayalu K y col., 2002).

A pesar de la controversia suscitada entre los investigadores, estos datos estarían reafirmando la hipótesis que el incremento de los niveles estrogénicos que favorecería el desarrollo y mantenimiento de la EDT estaría dado en parte por la síntesis autócrina de esteroides en endometrio.

La aplicación clínica de los denominados inhibidores de la aromatasas, ha estado focalizada fundamentalmente como un tratamiento adyuvante en el cáncer de mama; su posible aplicación en EDT fue inicialmente descrita en un caso de endometriosis pélvica en una mujer postmenopáusica que no había respondido a otras terapias como los anticonceptivos orales o agonistas de GnRH (Ebert AD y col., 2003; Takayama K y col., 1998).

Nuestro objetivo fue evaluar el posible empleo de los inhibidores de la aromatasas (drogas no esteroides con vida media relativamente corta y con efectos reversibles), como potencial terapéutico en pacientes con EDT.

Para comprobar la acción “in vivo” de estos compuestos hemos desarrollado un modelo de EDT experimental.

La EDT afecta sólo a mujeres y primates no humanos. Las especies comúnmente empleadas en la investigación médica no desarrollan naturalmente

EDT. Diversos grupos han ensayado introducir tejido endometrial en la cavidad peritoneal de conejos, ratas y ratones para estudiar múltiples aspectos de la enfermedad (Story L y Kennedy S, 2004). Los modelos actualmente más empleados son aquellos que emplean ratones inmunodeficientes que permiten el trasplante de tejido endometrial humano (Nisolle M y col., 2000). Estos modelos son útiles para evaluar el efecto de los tratamientos médicos en el endometrio ectópico (Grummer R y col., 2001) pero resultan inadecuados para entender la etiología y los factores predisponentes a desarrollar esta enfermedad y por lo tanto para ensayar tratamientos preventivos. Además ofrecen otras desventajas como heterogeneidad de las muestras a ser transplantadas, cuidados e infraestructura especial para el mantenimiento de dichos ratones, y el hecho de que el tejido se desarrolla en un ambiente inmunológicamente alterado. Por lo tanto decidimos desarrollar un modelo de EDT en ratones de la cepa Balb/c.

Empleamos primero el método basado en el trasplante singéneo de tejido endometrial en sitio ectópico. Para ello se utiliza un grupo de ratones hembras dador y un grupo aceptor. Sin embargo, nuestras observaciones indicaron que si bien se lograba el desarrollo de lesiones “endometriósicas”, las mismas presentaban un alto porcentaje de necrosis e infiltración linfocitaria, lo cual hacía dificultosa su evaluación.

Posteriormente ensayamos el modelo descrito por Fang y col. (Fang Z y col., 2002) en ratones Balb/c, el cual se basa en el trasplante autólogo de tejido endometrial en sitio ectópico. Nuestros resultados indicaron que se producía crecimiento de tejido endometrial ectópico observando además que en este modelo se producía menor proporción de necrosis e infiltración linfocitaria respecto al modelo anterior. Otras ventajas de este modelo es que no se requiere un reemplazo hormonal con pellet de E_2 , se emplea un menor número de animales y por tratarse de un autoimplante consideramos que presenta mayor semejanza con la EDT.

Empleando este último modelo, con ligeras modificaciones nuestros objetivos fueron: evaluar el efecto de los inhibidores de aromatasa (Letrozole y Anastrozole) sobre el establecimiento del endometrio ectópico in vivo y sobre la regresión del endometrio ectópico establecido. Para ello en cada grupo de ratones con EDT inducida se determinó el número y tamaño de las lesiones, la proliferación celular y la apoptosis.

Materiales y Métodos

Animales: Se utilizaron 51 ratones hembra Balb/c de 2 meses de edad del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental con alimento y agua *ad libitum*, bajo un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 22 °C y humedad constante. El cuidado y uso de los animales siguió las normas especificadas por la Asociación Argentina para la Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACyTAL).

Cirugía: Se indujeron lesiones endometriósicas mediante el transplante de uno de los cuernos uterinos al mesenterio del intestino como se ha descrito previamente (Fang Z y col., 2002). Brevemente, los animales se anestesiaron por vía i.p. 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 y se retiró colocándolo en medio estéril (DMEM-F12). Se abrió el cuerno uterino longitudinalmente y se cortó en dos cuadrados de aproximadamente 4 mm³. Dos porciones iguales de cuerno uterino se suturaron al mesenterio del intestino con un solo punto de sutura y se cerró el abdomen. Los animales fueron sacrificados a las cuatro semanas.

Diseño Experimental: Los 51 animales se dividieron en tres grupos: Control (n=19), Anastrozole (n=16) y Letrozole (n=16). A todos los animales se les realizó la cirugía para inducir la formación de lesiones endometriósicas y al día siguiente de la misma se comenzó con el tratamiento. Se les suministró una inyección diaria subcutánea de Anastrozole (10 µg/día

equivalente a 0,5 mg/Kg), Letrozole (10 µg/día equivalente a 0,5 mg/Kg) o solución salina. Transcurridos 28 días de tratamiento se sacrificaron los animales.

Evaluación del tejido ectópico: Los animales se sacrificaron por dislocación cervical luego de 4 semanas de tratamiento. Se abrió la cavidad abdominal, se contó el número de lesiones desarrolladas y se midieron los diámetros mayor (D) y menor (d) de cada lesión con un calibre. El tamaño de la lesión se calculó utilizando la siguiente fórmula $V=3/4.p.d^2.D$. Luego las lesiones fueron extraídas y fijadas en paraformaldehído para su posterior evaluación histológica.

La evaluación del tipo tisular presente en las lesiones se realizó en cortes teñidos con hematoxilina-eosina.

Evaluación de la proliferación celular: La proliferación celular se cuantificó mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo policlonal anti-PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), (PCNA, FL-261: sc-7907, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) en dilución 1/50. El anticuerpo secundario fue un anti-IgG de ratón, obtenido en conejo y biotinilado. Posteriormente se trataron las preparaciones con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Dako). A continuación se realizó el revelado con diaminobencidina (DAB, Dako) y después el contraste nuclear con hematoxilina de Harris.

La especificidad de la reacción se comprobó por incubación de las secciones con suero no inmune como sustituto del anticuerpo primario.

Evaluación de la apoptosis: En cortes histológicos de las lesiones se evaluó la presencia *in situ* de núcleos apoptóticos mediante una técnica basada en el método de TUNEL (Gavrieli Y y col., 1992). Para ello se empleó un kit Apoptag Plus S7101 (CHEMICON) que se fundamenta en la localización y marcación de los extremos 3'-OH ADN que se generan por la fragmentación de los ADN en las células apoptóticas.

Los controles positivos fueron suministrados por el fabricante del kit y consistían en cortes de tejidos de glándula mamaria murina obtenida 3-5 días después del destete. Los controles negativos se obtuvieron sometiendo cortes de tejido a tratamiento idéntico a las muestras a evaluar pero sin el agregado de la enzima transferasa deoxinucleotidil-terminal (TdT). Los porta-objetos teñidos fueron evaluados al microscopio óptico a 400x de magnificación, se evaluaron 300 células por muestra y se cuantificó el número de células apoptóticas / células totales.

Análisis Estadístico: Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Se realizó el test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test de múltiples comparaciones de Dunn. Sólo

los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Evaluación del número y tamaño de lesiones: El porcentaje de ratones que desarrollaron EDT y el número de lesiones encontradas por ratón fue similar en todos los grupos (Figura 1). Sin embargo, el tamaño de las lesiones endometriósicas expresadas como $X \pm SEM$ fue de $43 \pm 7.1 \text{ mm}^3$ en el grupo Control, mientras que en el grupo tratado con Anastrozole fue de $8.3 \pm 1.4 \text{ mm}^3$ ($p < 0.05$ vs. Control) y en el grupo tratado con Letrozole fue de $3.3 \pm 0.6 \text{ mm}^3$ ($p < 0.001$ vs. Control), (Figura 2).

Evaluación de la proliferación celular: En la evaluación de la proliferación celular en la fracción epitelial de las

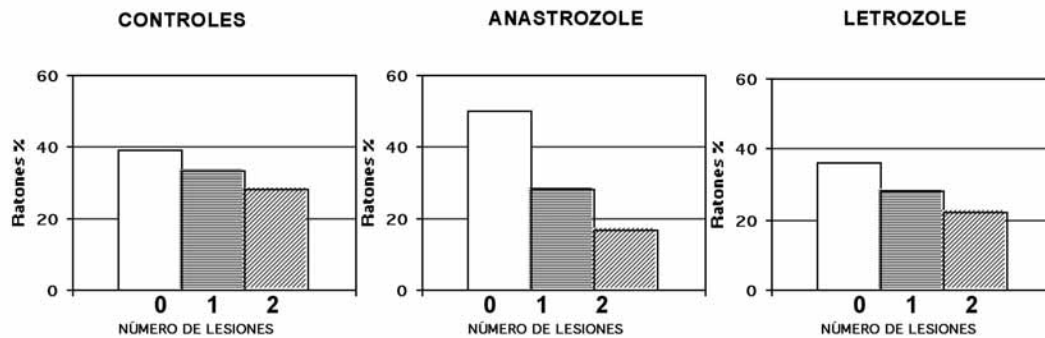


Figura 1: Porcentaje de ratones con: □ Ninguna lesión, ■ Una lesión, ▨ Dos lesiones, en el grupo Control, Tratado con Anastrozole y con Letrozole respectivamente.

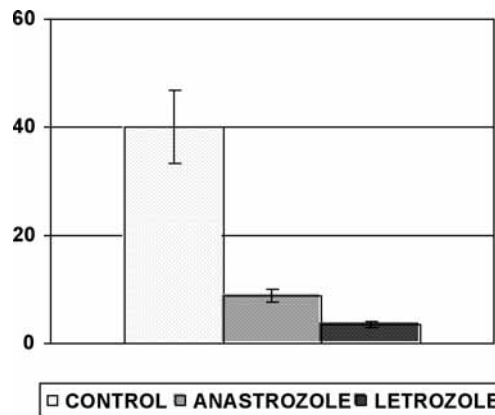


Figura 2: Tamaño de las lesiones en los grupos Control, y Tratados con Anastrozole y Letrozole. (* $p < 0.05$ Control vs. Anastrozole, y *** $p < 0.001$ Control vs. Letrozole).

lesiones endometriósicas inducidas, se observó una disminución significativa de la misma en los grupos tratados con inhibidores de aromatasa, tanto en el grupo tratado con Letrozole ($p < 0.01$) como con Anastrozole ($p < 0.001$), (Figura 3).

Evaluación de la apoptosis: Complementariamente a lo observado en relación a la proliferación celular, en la evaluación de la apoptosis en las lesiones endometriósicas inducidas, se halló que el tratamiento con inhibidores de aromatasa produjo un aumento significativo de la misma tanto con Anastrozole ($p < 0.05$) como con Letrozole ($p < 0.01$), (Figura 4).

Discusión

Avances en los conocimientos sobre la fisiopatología de la EDT han permitido que los investigadores piensen en nuevos mecanismos para tratar esta enfermedad, no solamente con el propósito de ofrecer simples alternativas terapéuticas, sino

además medicamentos que actúen en forma más directa 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 presentes (Crosignani P y col., 2006; Ferrero S y col., 2005).

Los inhibidores de aromatasa están siendo evaluados como alternativa terapéutica para la EDT ya que aparentan ser menos supresores que los análogos a nivel gonadal y poseerían menos efectos colaterales (Stockwell J, 2006).

En el presente trabajo hemos evaluado el efecto del tratamiento con inhibidores de aromatasa sobre el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas en un modelo de EDT murino.

Observamos que tanto el tratamiento con Letrozole como con Anastrozole al inicio de la inducción de las lesiones endometriósicas no impidió el desarrollo

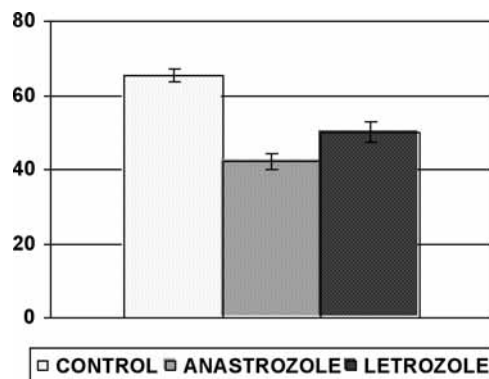


Figura 3: Proliferación celular de las lesiones endometriósicas inducidas en los grupos Control, y tratados con Anastrozole y Letrozole. (** $p < 0.01$ Control vs. Letrozole y *** $p < 0.001$ Control vs Anastrozole).

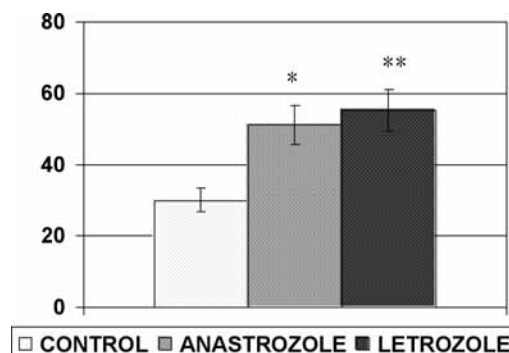


Figura 2: Tamaño de las lesiones en los grupos Control, y Tratados con Anastrozole y Letrozole. (* $p < 0.05$ Control vs. Anastrozole, y *** $p < 0.001$ Control vs. Letrozole).

de las mismas pero causó una disminución significativa de su tamaño.

Además, se observó que ambos inhibidores mostraron ser muy efectivos induciendo la inhibición de la proliferación celular al mismo tiempo que aumentaron significativamente la apoptosis.

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que observaron que el tratamiento con inhibidores de aromataasa tanto en un modelo de EDT en ratas (Kudoh M y col., 1997; Yano S y col., 1996) como en ratones de la cepa C57BL6 (Fang Z y col., 2002), producía una disminución en el tamaño de las lesiones de manera dosis dependiente. De acuerdo a las observaciones de Fang y col (Fang Z y col., 2002) el efecto se observa a partir de una concentración mínima de 5 µg/día en ratones, mientras que dosis mayores a 20 µg/día no incrementan la efectividad.

En este estudio hemos usado una dosis diaria tanto de Letrozole como de Anastrozole de 10 µg, durante 28 días a partir de la inducción de la EDT, sin embargo no descartamos la posibilidad de que un tratamiento más prolongado o una dosis mayor de cualquiera de estos inhibidores produzcan una regresión total de las lesiones.

Investigaciones “in vitro” realizadas en nuestro laboratorio empleando cultivo de células de epitelio endometrial de pacientes con EDT permitieron demostrar que tanto el Letrozole como el Anastrozole producían una significativa disminución de la proliferación celular y un aumento en la apoptosis (Meresman GF y col., 2005). Otros autores han observado efectos semejantes en células epiteliales de tumores de mama humanos (Mitropoulou TN y col., 2003; Thiantanawat A y col., 2003).

Takayama y col.. (Takayama K y col., 1998) fueron quienes reportaron por primera vez el uso de Anastrozole en el tratamiento de una paciente postmenopáusica con una masa endometriótica pélvica (luego de una histerectomía y anexectomía bilateral), y que previamente había fallado a otros tratamientos médicos.

Resultados similares fueron obtenidos por Fatemi y col. (Fatemi HM y col., 2005) en otra paciente post menopáusica con EDT tratada con Letrozole durante 18 meses.

Recientemente se han publicado algunos estudios piloto sobre el uso de inhibidores de aromataasa en mujeres en edad reproductiva. Ailawadi y col (Ailawadi RK y col., 2004) emplearon Letrozole durante 6 meses en diez pacientes jóvenes con EDT y dolor crónico, que no habían respondido a otros tratamientos médicos ni a la cirugía. En este caso se le suministró el inhibidor de aromataasa junto con el progestágeno noretindrona, citrato de calcio y vitamina D para evitar las consecuencias secundarias, observando en un segundo examen laparoscópico que las lesiones habían desaparecido. Hefler y col (Hefler LA y col., 2005) han empleado Anastrozole por vía vaginal en pacientes jóvenes con EDT retrovaginal y Amsterdam y col (Amsterdam LL y col., 2005) usaron Anastrozole en combinación con etinil estradiol/levonorgestrel en pacientes premenopáusicas con EDT y dolor crónico. Ambos grupos demostraron una significativa mejoría de las pacientes con estos tratamientos.

Nuestros resultados refuerzan la idea de que la inhibición de la aromataasa, sería una estrategia terapéutica novedosa a usar en pacientes con EDT ya que hemos hallado que tanto el Letrozole como el Anastrozole produjeron la supresión de la proliferación celular y el incremento de la apoptosis que favorecería la desaparición de las lesiones.

Asimismo consideramos que el modelo de EDT experimental establecido será de suma utilidad para evaluar el efecto “in-vivo” de nuevas terapias médicas para el tratamiento de esta patología.

Bibliografía

1. Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, y Bulun SE (2004) Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 81, 290-296.

2. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, y Bulun SE (2005) Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 84, 300-304.
3. Brosens J, Verhoeven H, Campo R, Gianaroli L, Gordts S, Hazekamp J, Hagglund L, Mardesic T, Varila E, Zech J y col. (2004) High endometrial aromatase P450 mRNA expression is associated with poor IVF outcome. *Hum Reprod* 19, 352-356.
4. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, Tamura M, Sebastian S, Zhou J, Amin S, y Yang S (2002) Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 55, 21-33.
5. Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J, y Sebastian S (2001) Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79, 19-25.
6. Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, y Luciano A (2006) Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update* 12, 179-189.
7. D'Hooghe TM, Kyama C, Debrock S, Meuleman C, y Mwenda JM (2004) Future directions in endometriosis research. *Ann N Y Acad Sci* 1034, 316-325.
8. Dheenadayalu K, Mak I, Gordts S, Campo R, Higham J, Puttemans P, White J, Christian M, Fusi L, y Brosens J (2002) Aromatase P450 messenger RNA expression in eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 78, 825-829.
9. Ebert AD, Bartley J, David M, y Schweppe KW (2003) [Aromatase inhibitors—theoretical concept and present experiences in the treatment of endometriosis]. *Zentralbl Gynakol* 125, 247-251.
10. Fang Z, Yang S, Gurates B, Tamura M, Simpson E, Evans D, y Bulun SE (2002) Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3460-3466.
11. Fatemi HM, Al Turki HA, Papanikolaou EG, Kosmas L, De Sutter P, y Devroey P (2005) Successful treatment of an aggressive recurrent post-menopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Reprod Biomed Online* 11, 455-457.
12. Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, y Ragni N (2005) Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Surv* 60, 817-826.
13. Gavrieli Y, Sherman Y, y Ben Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.
14. Giudice LC y Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet* 364, 1789-1799.
- Grummer R, Schwarzer F, Bainczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, y Winterhager E (2001) Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod* 16, 1736-1743.
15. Hefler LA, Grimm C, van Trotsenburg M, y Nagele F (2005) Role of the vaginally administered aromatase inhibitor anastrozole in women with rectovaginal endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 84, 1033-1036.
16. Kudoh M, Susaki Y, Ideyama Y, Nanya T, Mori M, y Shikama H (1997) Inhibitory effects of a novel aromatase inhibitor, YM511, on growth of endometrial explants and insulin-like growth factor-I gene expression in rats with experimental endometriosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63, 75-80.
17. Meresman GF, Bilotas M, Abello V, Buquet R, Tesone M, y Sueldo C (2005) Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 84, 459-463.
18. Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Kletsas D, Kalofonos HP, y Karamanos NK (2003) Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer* 104, 155-160.
19. Nisolle M, Casanas-Roux F, y Donnez J (2000) Early-stage endometriosis: adhe-

- sion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil Steril* 74, 306-312.
20. Noble LS, Simpson ER, Johns A, y Bulun SE (1996) Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 174-179.
21. Remohí J y Levy M (1995) Tratamiento médico de la endometriosis. 255-269.
22. Seli E, Berkkanoglu M, y Arici A (2003) Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30, 41-61.
23. Stockwell J (2006) Endometriosis: clinical assessment and medical management. *Adv Nurse Pract* 14, 43-45.
24. Story L y Kennedy S (2004) Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J* 45, 132-138.
25. Taga S, Yoshida N, y Sekiba K (1990) Distribution and cyclic change of aromatase cytochrome P-450 activity in human uteri. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 741-745.
26. Takayama K, Zeitoun K, Gunby RT, Sasano H, Carr BR, y Bulun SE (1998) Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 69, 709-713.
27. Thiantanawat A, Long BJ, y Brodie AM (2003) Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 63, 8037-8050.
28. Tseng L (1984) Estrogen synthesis in human endometrial epithelial glands and stromal cells. *J Steroid Biochem* 20, 877-881.
29. Tseng L, Mazella J, Mann WJ, y Chumas J (1982) Estrogen synthesis in normal and malignant human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 55, 1029-1031.
30. Yano S, Ikegami Y, y Nakao K (1996) Studies on the effect of the new non-steroidal aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride in an endometriosis model in rats. *Arzneimittelforschung* 46, 192-195.

Mar del Plata

Crecer

Director: Dr. Edgardo Andreatta

San Lorenzo 3071 - Mar del Plata
Tel. (054) 0223-472-8044
info@crecerreproduccion.com.ar - www.crecerreproduccion.com.ar

San Isidro

Unidad de Fertilidad San Isidro

Director: Dr. Claudio Ruhlmann

Av. Libertador 16483 - San Isidro
Tel. (054) 4742-9000 - unifer@arnet.com.ar



PROAR
PROGRAMA DE ASISTENCIA REPRODUCTIVA DE ROSARIO

Director Médico Dr. Carlos Morente	Laboratorio Bioquímico Bioq. Carlos Sosa Bioq. Irma Re	Médicos del Programa Dr. Edgardo Almanzo Dr. Hugo Alonso Dr. Alberto Badano Dra. Doris Bellmann Dr. Fernando Premoli Dr. Alejandro Ridley Dr. Anibal Rodriguez Pécora Dr. Enrique C. Roncoroni Dr. Enrique A. Roncoroni Dr. Ernesto Rouillón Dr. Alfonso Benítez Gil Dr. Cesar Berta Dr. Antonio Diez Dr. Rodolfo Feldman Dra. Alejandra Hallberg Dr. Oscar González Lowy Dr. Raúl Musachio Dra. Constanza Nazario Dra. Marisa Osta Dra. Patricia Perfumo Dra. Malen Pijoan Molinas Dr. Daniel Sandín Dra. Viviana Ventura Dr. Pablo Weiss
Comité Científico Dr. Gustavo Botti Dr. Pedro Figueroa Casas Dr. Hector Miechi Dr. Roberto Tozzini	Visitadora Social Sra. Nora Del Felice	
Ecografía Dr. Luis Bégúe Dra. Anabella Lima	Coordinadora Sra. Norma Rivero Dra. Carla López	
Laboratorio Biológico Bioq. Claudia Brignardello Biol. Nora Monjes Bioq. Mariana Perez	Psicóloga Lic. Miriam Girolami Lic. Ana Luisa De Palma	
	Enfermería Sra. Delia Bournisent	

Sanatorio Los Arroyos - proar-rosario@arnet.com.ar - Italia 1440 1° Piso
Tel. (54) 341 - 4244385 - Rosario