

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

Autores: Gabriela Meresman¹, Carla Olivares¹, Mariela Bilotas¹, Ricardo Buquet², Carlos Sueldo³, Marta Tesone¹.

1 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

2 Serv. de Ginecología, Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina.

3 Centro de Ginecología y Reproducción, CEGYR, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar la endometriosis es constante. Basándonos en trabajos previos que advierten sobre los efectos anti-angiogénicos, anti-proliferativos y pro-apoptóticos de celecoxib en células tumorales, propusimos estudiar su efecto sobre el crecimiento endometrial in-vitro. Partiendo de biopsias de endometrio eutópico de 14 pacientes con endometriosis y 10 controles se realizaron cultivos de células epiteliales endometriales (CEE) y luego de 48 hs, se agregaron distintas dosis de celecoxib. Se evaluó apoptosis por el método de naranja de acridina - bromuro de etidio y el porcentaje de proliferación celular con respecto al basal por incorporación de 3H-timidina. Se evaluaron los niveles del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en los sobrenadantes de CEE

por ELISA y la expresión de COX-2 por western blot e inmunocitoquímica. El celecoxib a dosis de 10, 20, 25 y 40 μ M no produjo efecto significativo sobre el porcentaje de proliferación celular ni sobre la apoptosis en CEE de pacientes con endometriosis y controles.

Concentraciones más elevadas de celecoxib inhibieron el porcentaje de proliferación celular en CEE provenientes de controles: 58 ± 5 , 43 ± 11 , 36 ± 8 y de pacientes: 55 ± 4 , 37 ± 4 , 34 ± 3 (para 50, 75 y 100 μ M, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respect. vs basal). Asimismo celecoxib 50, 75 y 100 μ M incrementó la apoptosis tanto en CEE de controles: 2.5 ± 0.4 , 2.7 ± 0.3 , 3.1 ± 0.5 como de pacientes con endometriosis: 2.8 ± 0.4 , 3.3 ± 0.6 , 3.1 ± 0.8 (expresado como veces de aumento $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.01$ respect. vs basal). Nuestros resultados preliminares muestran una inducción de la expresión de COX-2 por parte

de celecoxib que podría explicarse como una inhibición del proceso de retroalimentación negativo que regula la expresión de la enzima. Asimismo celecoxib indujo una disminución de la producción de VEGF por parte de CEE, hecho que se relacionaría con la inhibición de la angiogénesis. Estos datos sugieren que celecoxib favorecería la regresión de la lesión endometriósica inhibiendo la proliferación celular, induciendo la apoptosis y disminuyendo la angiogénesis y avalan a esta droga para continuar siendo evaluada como alternativa terapéutica para la endometriosis.

Introducción

La endometriosis se define como la presencia de focos de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Es la enfermedad ginecológica benigna más frecuente, afectando a un 2-22 % de las mujeres en edad reproductiva. Por otro lado, un 40-60% de las pacientes que se someten a laparoscopias por dolor pélvico- presentan esta patología (1).

La endometriosis ha sido identificada como una patología dependiente de estrógenos (2). En ese sentido, uno de los últimos hallazgos más relevantes ha sido la detección de aromatasa P450, enzima responsable de la conversión de testosterona a estradiol, en tejido endometrial eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis y la ausencia de expresión en el endometrio de mujeres sanas (3;4). Se ha propuesto además, que la producción de estradiol en el tejido endometriósico estaría induciendo un proceso de retro-alimentación positivo hacia la inducción de transcripción de ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) y expresión de aromatasa P450 (5-8). Este proceso favorecería la acumulación de estrógenos y potenciaría la inflamación (ver esquema 1).

La síntesis de prostaglandinas es controlada por dos enzimas ciclooxigenasa (COX): COX-1 y COX-2. Mientras que COX-1 se expresa en forma constitutiva en

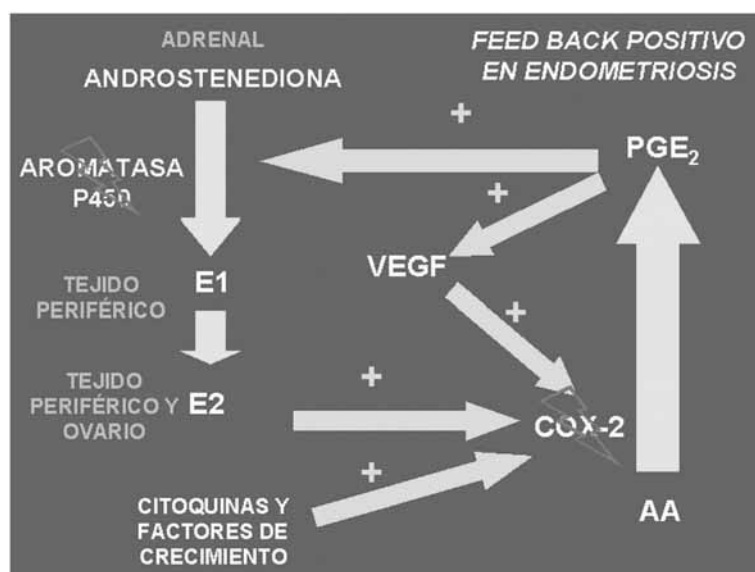
células humanas, COX-2 es una enzima inducible que se sobre-expresa en condiciones patológicas tales como cáncer o procesos inflamatorios (9). Coincidentemente, se ha hallado sobre-expresión de COX-2 (10) y aromatasa P450 (6) en tejido endometriósico y niveles elevados de PGE2, entre otras moléculas pro-inflamatorias, en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis (11).

El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es una familia de proteínas que están implicadas tanto en la angiogénesis fisiológica como así también en varias condiciones patológicas que se caracterizan por una excesiva vascularización (12-14). Recientemente tanto nosotros como otros autores hemos publicado evidencias que sugieren que el VEGF podría estar involucrado en la etiología y mantenimiento de la endometriosis actuando como factor angiogénico e inhibitorio de la apoptosis (15;16). El VEGF es producido por células endometriósicas y macrófagos peritoneales y sería uno de los factores decisivos en el origen y desarrollo de esta patología. Además se ha demostrado que una serie de citoquinas, cuyos niveles se hallan aumentados en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, especialmente la IL-1, incrementan la producción de VEGF en las células endometriósicas y en otros tejidos (17;18). Se ha observado además que el VEGF participa del crecimiento endometriósico no sólo a través de la inducción de la angiogénesis sino también, estimulando la expresión de COX-2 (19). Siendo así la inhibición de la actividad de aromatasa y/o de COX-2 constituye una estrategia novedosa y atrayente para intentar desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el control de la endometriosis (Esquema 1).

En los últimos años, el estudio del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis ha cobrado real importancia. Diferentes autores han detectado anomalías en el tejido endometrial eutópico de las pacientes (20-22). En ese sentido, nuestros datos han demostrado que las

Esquema 1:

Proceso de retroalimentación positivo inductor del crecimiento celular, vascularización e inflamación en la lesión endometriósica



Las nuevas estrategias propuestas para el tratamiento de la endometriosis apuntan a la inhibición de la enzima aromatasa P₄₅₀ y/o de COX-2. VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular, AA: ácido araquidónico, PGE₂: prostaglandina E₂, COX-2: ciclo-oxigenasa 2, E1: estrón, E2: estradiol

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 (23-25).

Por otro lado, es sabido que la terapéutica que se les propone actualmente a las pacientes con endometriosis no es del todo efectiva 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 (26). Dada esta situación, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes, y que acarreen menos efectos colaterales, es constante.

Los inhibidores de aromatasa anastrozole y letrozole son utilizados con éxito en la terapéutica del cáncer de mama (27). Además del efecto supresor de la síntesis de estrógenos, se conocen efectos inductores de la apoptosis y antiproliferativos directos de estos compuestos sobre algunos tipos celulares (28). En un estudio reciente hemos observado que tanto anastrozole como letrozole dismi-

nuyen la proliferación celular e incrementan la apoptosis en las células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis (29).

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) como la Aspirina® o el Ibuprofeno® inhiben la actividad de COX. Celecoxib pertenece a una nueva generación de AINEs que inhiben selectivamente COX-2 sin inhibir COX-1. Asimismo, este compuesto está siendo últimamente evaluado por sus efectos inhibitorios de la progresión tumoral. Específicamente, han sido descritos efectos anti-angiogénicos, anti-proliferativos y pro-apoptóticos tanto in-vitro, in-vivo, como en ensayos clínicos actualmente en curso (30-32). Más aún, en estudios recientes se ha demostrado que celecoxib inhibe el crecimiento tumoral induciendo la apoptosis de manera independiente de su capacidad para bloquear la COX-2 (31;33). Se ha propuesto además que celecoxib actuaría en forma sinérgica con inhibidores de aromatasa en el tratamiento del cáncer de mama, efecto que también se está evaluando a través de un estudio clínico actualmente en curso (27).

A pesar de que celecoxib es utilizado como potente anti-inflamatorio 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. Por todo lo expuesto, consideramos de suma importancia evaluar los efectos de este fármaco en un modelo de cultivo de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis y controles, sobre la apoptosis, proliferación celular, expresión de COX-2 y niveles de VEGF. Este trabajo tiene como finalidad el estudio experimental de nuevas alternativas terapéuticas que están últimamente siendo propuestas para tratar la endometriosis.

Materiales y Métodos

Pacientes

Se evaluaron un total de 24 mujeres en edad reproductiva con ciclos ovulatorios regulares que no recibieron ningún tipo de tratamiento médico para la endometriosis en los 12 meses previos al estudio.

Catorce pacientes fueron diagnosticadas laparoscópicamente con endometriosis I y II y confirmadas histológicamente. La clasificación de la endometriosis se realizó siguiendo la clasificación revisada propuesta por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (34). El grupo control consistió en 10 mujeres que se sometieron a laparoscopias diagnósticas por dolor abdominal, obstrucción de trompas o esterilidad sin causa aparente y que no padecían endometriosis u otra patología de origen infeccioso o tumoral que pudiera alterar la población celular a evaluar.

A todas las mujeres se les tomó biopsias de endometrio con cureta de Novak (Bioteque America Inc. Longhorne PA) durante la fase proliferativa de acuerdo a lo descrito anteriormente (25).

Las muestras se depositaron en condiciones de esterilidad, en medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco, Paisley Gran Bretaña) con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml

de anfotericina B (Gibco) y se trasladaron inmediatamente al laboratorio donde se realizó el estudio experimental de cultivo celular in-vitro.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) y todas las pacientes que participaron firmaron un consentimiento informado.

Aislamiento y Cultivo de Células Epiteliales de endometrio humano

Se siguió la técnica descrita anteriormente (25). Brevemente, luego de la digestión se colocó la muestra en medio de cultivo con 1 mg/ml de colagenasa (Gibco, tipo I) y se incubó durante dos horas en estufa gaseada a 37°C y 5% CO₂. Transcurrida la colagenización se centrifugó la suspensión de células 5 minutos a 100xg, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento con medio de cultivo y se centrifugó por otros 5 minutos a 100xg. 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 fue evaluado por la presencia de citoqueratina, proteína típica de la fracción epitelial, por técnicas de inmunocitoquímica (25).

Evaluación de la proliferación celular

Luego de purificar las células epiteliales endometriales, se sembraron 50.000 cél/pocillo en placas plásticas de 96 pocillos y se incubaron con medio de cultivo con 10% SBF. Luego de 48 horas, las células se lavaron y se agregó el celecoxib en dosis de 10, 20, 25, 40, 50, 75 y 100 µM al medio de cultivo suplementado con 2.5% SBF. Las células fueron incubadas por otras 48 horas.

Veinticuatro horas antes de la cosecha se agregó 1µCi de 3H-timidina (Nen, Dupont, Boston, MA) a cada pocillo y se evaluó la síntesis de ADN mediante el método de incorporación de 3H-timidina utilizando un contador de centelleo líquido automático (35).

Evaluación de la apoptosis

Luego de cultivar durante 48 horas las células epiteliales en condiciones basales, se cambió el medio de cultivo a DMEM-F-12 con 2,5% de SBF y se agregó celecoxib (10, 20, 25, 40, 50, 75 y 100 μ M). 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 (36;37). Luego de agregar la mezcla de naranja de acridina (1 mg/l) - bromuro de etidio (250 mg/l), las células fueron observadas y contadas bajo microscopio de fluorescencia. Se contaron un total de 300 células por pocillo y se expresaron los datos en porcentaje de células que presentaban núcleo teñido de anaranjado (apoptóticas tempranas + tardías) sobre número total de células.

Evaluación de la expresión de COX-2

Se estudió la expresión de la enzima COX-2 por western blot e inmunocitoquímica en cultivos de células epiteliales endometriales provenientes de 14 pacientes con endometriosis. Para la realización de la técnica de western blot nos basamos en metodologías anteriormente descritas (30). Luego de 24 horas de incubación se retiró el medio de cultivo y se levantaron las células raspándolas con un rastrillo en buffer lisis a 4°C. Se extrajeron las proteínas y se cuantificaron usando el método de Bradford (38). Se solubilizaron alícuotas de los extractos proteicos conteniendo 20 μ g de proteínas en buffer loading. Las alícuotas se sometieron a una electroforesis en un gel 10% de poliacrilamida con SDS y las bandas proteicas resultantes se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los productos proteicos se visualizaron con un anticuerpo policlonal anti-COX-2 hecho en conejo (Santa Cruz, sc-1747) mediante procedimientos estándar de western blotting. Asimismo se evaluó la expresión de β -actina en cada calle incubando con el anticuerpo anti- β -actina (mouse monoclonal anti-human β -actin, Abcam, Cambridge, UK). Se trató la

membrana con una solución de leche descremada 5% para bloquear el pegado inespecífico y se incubó con el primer anticuerpo a 4°C durante toda la noche. Luego se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o de ratón conjugado a peroxidasa. La visualización de las bandas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Inc) y la cuantificación se realizó por análisis densitométrico de las bandas normalizadas con la expresión de β -actina correspondiente a cada calle.

Asimismo se realizó la técnica de inmunocitoquímica (10) sobre las mismas células tratadas con idénticos estímulos. Brevemente, se sembraron 150.000 células epiteliales endometriales por pocillo en lab-tek (Nalge Nunc International, USA) y se cultivaron en condiciones basales durante 48 horas. Se cambió el medio de cultivo a DMEM F-12 con 2,5% de SBF y se agregó celecoxib (25, 40, 50, 75 y 100 μ M). Luego de 24 horas de incubación se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se dejó secar en estufa a 37°C durante 2 horas. La detección de las proteínas se realizó utilizando el mismo anticuerpo que para el western blot. Se fijaron las células con 4% de formaldehído y se permeabilizaron con 0,2% Triton X-100. Se inactivó la peroxidasa endógena con 3% de H₂O₂ y se eliminó el pegado inespecífico bloqueando con 2% de sero-albúmina bovina (BSA). A continuación se incubó con el primer anticuerpo 1 hora a temperatura ambiente y se reveló mediante el cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato (DAB) utilizando el kit LSAB+ (Dako Ltd.). Finalmente se realizó una tinción de contraste con hematoxilina. Los controles negativos se obtuvieron sometiendo cultivos a tratamiento inmunocitoquímico idéntico a las muestras a evaluar pero sin el agregado del primer anticuerpo, asimismo se realizaron controles de isotipo. En este caso, se evaluó la expresión de la proteína en forma cualitativa.

Evaluación de los niveles de VEGF

Se evaluaron los niveles de VEGF en los sobrenadantes de los cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis tratados con celecoxib mediante la técnica de ELISA siguiendo procedimientos anteriormente descritos (39) y utilizando un kit comercial (Cytelisa, Human VEGF kit, EL-V, Cytimmune).

Cálculos estadísticos

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test de múltiple comparación de Dunn. Los resultados se expresaron como media * SEM. Se consideró estadísticamente significativo solamente aquellos valores cuyo $p < 0.05$. La varianza se analizó mediante el método de

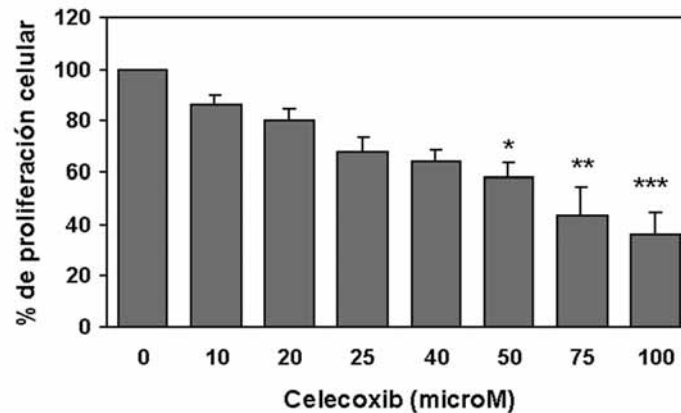
ANOVA. En todos los casos se utilizaron procedimientos de doble ciego.

Resultados

Efecto del inhibidor selectivo de COX-2 celecoxib sobre la proliferación celular de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis y controles

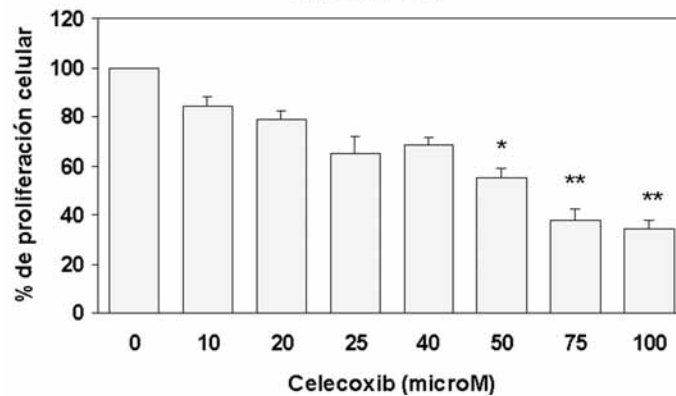
En la Figura 1 y en la Figura 2 se pueden observar los efectos de diferentes concentraciones de celecoxib sobre la proliferación celular epitelial endometrial. Hemos observado que el celecoxib a concentraciones bajas no posee efecto sobre la síntesis de ADN basal. Por otro lado, concentraciones de 50, 75 y 100 μM de celecoxib inhibieron significativamente

Figura 1: proliferación celular en cultivos de células epiteliales endometriales de mujeres controles



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. basal (sin celecoxib)

Figura 2: proliferación celular en cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. basal (sin celecoxib)

la proliferación celular. Este patrón de inhibición de la proliferación celular se observó tanto en cultivos de pacientes con endometriosis como en controles. Los datos numéricos se expresan en la tabla I.

Efecto del inhibidor selectivo de COX-2 celecoxib sobre la apoptosis de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis y controles

En la Figura 3 y en la Figura 4 se pueden observar los efectos de diferentes

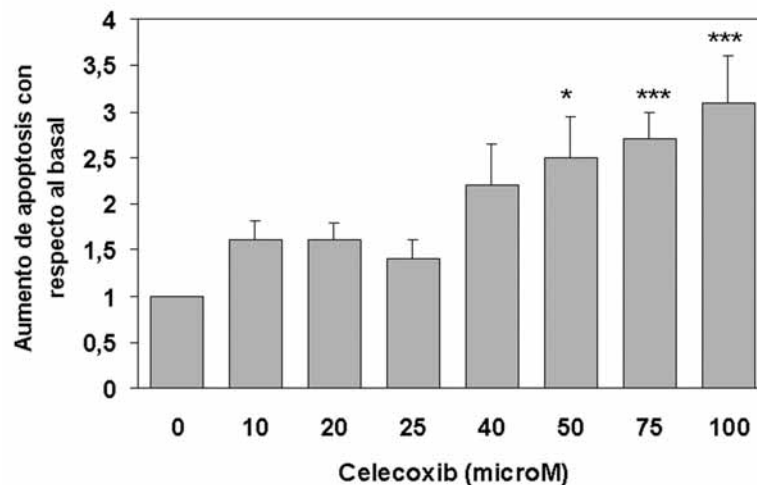
concentraciones de celecoxib sobre la apoptosis en cultivos de células epiteliales endometriales de mujeres controles y de pacientes con endometriosis. Hemos observado que en ambos casos el celecoxib 50, 75 y 100 µM incrementa significativamente los niveles de apoptosis en cultivos de pacientes con EDT y controles. Por otro lado el Celecoxib en concentraciones 10, 20, 25 y 40 µM no produjo efecto sobre la apoptosis basal en los cultivos evaluados. Los datos numéricos se expresan en la tabla I.

Tabla I: Efecto de celecoxib sobre la proliferación celular y la apoptosis de células epiteliales endometriales en cultivo de pacientes con endometriosis y controles

	Celecoxib 10µM	Celecoxib 20µM	Celecoxib 25µM	Celecoxib 40µM	Celecoxib 50µM	Celecoxib 75µM	Celecoxib 100 µM
Control							
Proliferación celular (% del basal)	86.6±3.7	80.2±4.0	67.7±5.6	64.2±4.1	58.0±5.8*	43.7±11.0**	36.2±8.3***
Células apoptóticas (veces de aumento)	1.6±0.22	1.6±0.19	1.4±0.2	2.2±0.45	2.5±0.44*	2.7±0.3***	3.1±0.5***
Endometriosis							
Proliferación celular (% del basal)	84.3±4.0	79.0±3.2	64.9±6.8	68.3±3.0	55.0±4.3*	37.6±4.8**	34.0±3.5**
Células apoptóticas (veces de aumento)	1.4±0.23	1.2±0.34	1.0±0.31	2.2±0.27	2.8±0.47***	3.3±0.6***	3.1±0.8**

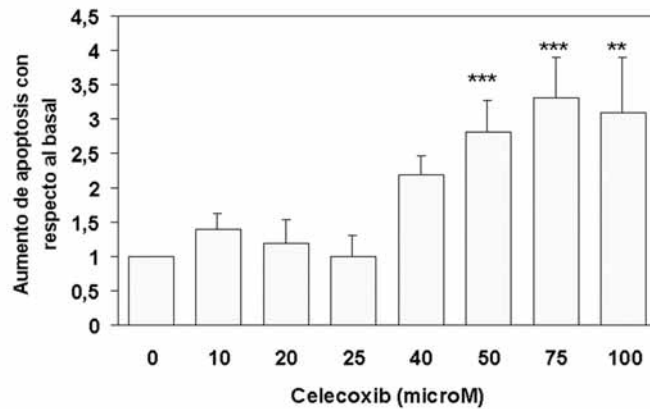
Media ± SEM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. basal

Figura 3: Apoptosis en cultivos de células epiteliales endometriales de mujeres controles



*p<0.05, *** p<0.001 vs. basal (sin celecoxib)

Figura 4: Apoptosis en cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis



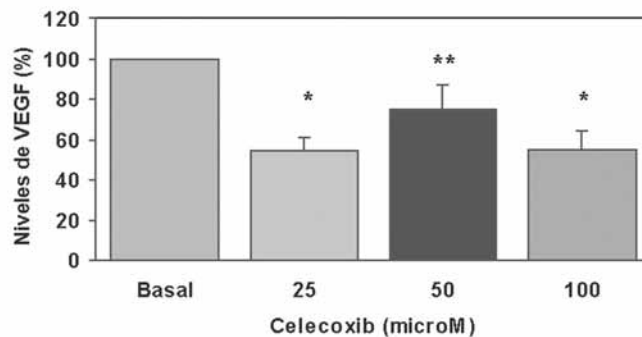
** p<0.01, *** p<0.001 vs. basal (sin celecoxib)

Efecto del inhibidor selectivo de COX-2 celecoxib sobre la secreción de VEGF por parte de las células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis y controles

En la Figura 5 se puede observar el efecto inhibitorio que produjo el celecoxib en todas las concentraciones evalua-

das sobre la secreción de VEGF por parte de las células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis. El agregado de celecoxib 25, 50 y 100 μ M indujo una inhibición de los niveles de VEGF con respecto al basal: 54 ± 7 , 75 ± 12 y 55 ± 9 % (p<0.001, 0.05 y 0.001 vs. basal respectivamente).

Figura 5: Niveles de VEGF en sobrenadantes de cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis



*p<0.001, ** p<0.05 vs. Basal (sin celecoxib)

Efecto del celecoxib sobre la expresión de COX-2 en las células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis y controles

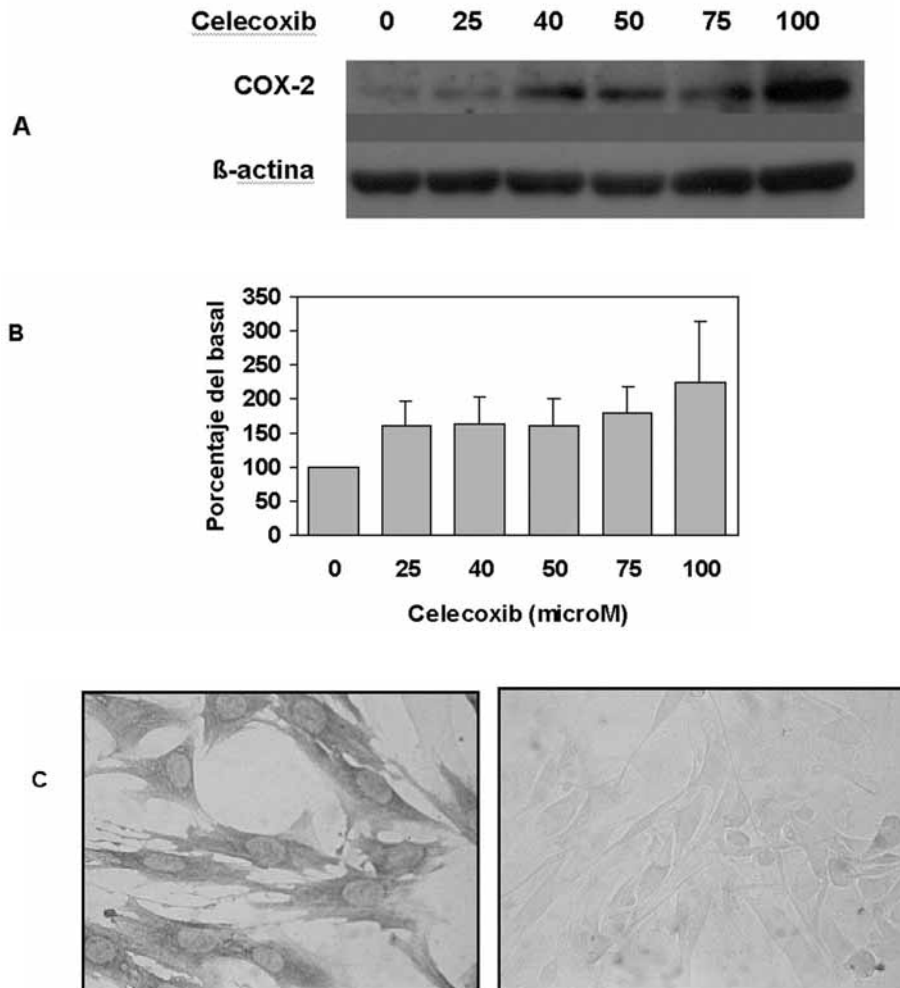
Nuestros estudios preliminares advierten sobre una tendencia hacia la inducción de la expresión de COX-2 por parte de

celecoxib que sería dosis dependiente (Figura 6). Si bien nuestros resultados no poseen aún significancia estadística, los datos muestran una tendencia hacia la inducción de la expresión de la proteína que acuerda con datos similares reportados en otros sistemas (30).

Asimismo los estudios de inmunocitoquímica demostraron la expresión de COX-2 en los cultivos tratados con distintas dosis de celecoxib. Hemos obser-

vado expresión de la enzima en el citoplasma tanto de las células tratadas con 25, 40, 50, 75 y 100 μM de celecoxib como en las basales.

Figura 6: Efecto de celecoxib sobre la expresión de COX-2



A: Fotografía representativa de western blot para identificación de COX-2 y β -actina en extractos proteicos extraídos de cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis estimulados con celecoxib.

B: Análisis densitométrico de la expresión de COX-2 normalizada con β -actina en cultivos de células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis estimulados con celecoxib.

C: Fotografías representativas de la evaluación de la expresión de COX-2 por la técnica de inmunocitoquímica en cultivos de células epiteliales endometriales de una paciente con endometriosis estimulado con celecoxib 50 μM (panel de la izquierda) comparado al control negativo (panel de la derecha).

Discusión

Avances en los conocimientos sobre la fisiopatología de la endometriosis 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 el desarrollo de la enfermedad, y que potencialmente sean más eficaces en su acción de erradicar las lesiones endometriósicas (26;40).

Los cultivos de células epiteliales de endometrio eutéopico fueron usados como modelo para estudiar el impacto del inhibidor de ciclo-oxigenasa-2, celecoxib, sobre la proliferación celular y apoptosis. 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 cultivos a corto plazo como modelo para las lesiones endometriósicas ha sido descrito previamente en la literatura (41) y es aceptado que este modelo permite establecer un correcto paralelismo con las lesiones endometriósicas.

En el presente estudio hemos observado que el celecoxib fue capaz de inhibir significativamente la proliferación celular e inducir la apoptosis de las células endometriales tanto de pacientes como de controles. Dado que COX-2 se sobreexpresa en las lesiones endometriósicas, es posible especular que el efecto de celecoxib resultaría eficiente en el control del crecimiento endometriósico.

Si bien estos resultados son inéditos en endometriosis, nuestros datos acuerdan con los reportados por otros autores que utilizaron inhibidores de COX-2 y lograron inhibir el crecimiento tumoral. 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 líneas celulares tumorales (42-44). Asimismo en un modelo de endometriosis en rata se

demonstró que el inhibidor selectivo de COX-2 previene el desarrollo de los implantes ectópicos e inhibe el crecimiento del tejido endometriósico de las lesiones ya establecidas (32).

Los resultados obtenidos en nuestro modelo in-vitro acuerdan con los datos de Basu y col. y de Jendrosseck y col. quienes observaron que celecoxib induce apoptosis en células humanas de cáncer de mama y en la línea celular Jurkat de linfocitos T (30;31).

Asimismo nuestros resultados preliminares muestran una tendencia hacia la inducción de la expresión de COX-2 por parte de celecoxib. En este momento nos encontramos terminando algunos experimentos de western blot para optimizar el análisis estadístico. No obstante, el fenómeno que estamos hallando se ha observado también en líneas celulares de cáncer de mama donde el celecoxib a dosis de 60 μ M indujo la expresión de la proteína COX-2 (30). Este fenómeno se podría explicar por una inhibición del proceso de retro-alimentación negativo: la acumulación del producto de la enzima inhibe la expresión de COX-2. Cuando se inactiva la enzima, dejaría de acumularse PGE2 y se induciría la expresión de COX-2. Por otro lado, hay reportes en otros sistemas celulares que indican que celecoxib inhibe el crecimiento tumoral de manera independiente de la expresión de COX-2 (33;44).

Asimismo los estudios de inmunocitoquímica demostraron la expresión de COX-2 en los cultivos tratados con distintas dosis de celecoxib. Hemos observado expresión de la enzima en el citoplasma tanto de las células tratadas con celecoxib como en las basales. En evaluaciones previas realizadas en cortes histológicos de tejido endometrial de pacientes con endometriosis hemos hallado también expresión de COX-2, especialmente en las glándulas epiteliales (datos no mostrados).

En nuestro estudio hemos observado que celecoxib indujo una disminución de la producción de VEGF por parte de las células epiteliales endometriales, hecho que se relacionaría con la inhibición de la angiogénesis. La angiogénesis

es un proceso fundamental implicado en la vascularización y por lo tanto en el desarrollo de la lesión endometriósica (16;45). 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 (46). 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.

En trabajos previos ha sido reportado que el celecoxib inhibe la angiogénesis e induce la apoptosis de células endoteliales tanto in-vivo como in-vitro (19;47). Acordando con nuestros resultados se ha observado también que este compuesto disminuye los niveles de VEGF en distintos sistemas celulares (19;30;48).

Si bien celecoxib fue aprobado para el tratamiento de osteoartritis y como terapia complementaria para el tratamiento del cáncer colorectal (19) no ha sido probado aún para el tratamiento de endometriosis, a pesar de que algunos investigadores están empezando a pensar en esta opción como posible terapéutica futura (26;49).

Nuestros datos sugieren que celecoxib favorecería la regresión de la lesión endometriósica, inhibiendo la proliferación celular, induciendo la apoptosis y disminuyendo la angiogénesis y avalan a esta droga para continuar siendo evaluada como alternativa terapéutica para la endometriosis.

Bibliografía

1. Murphy AA. Clinical aspects of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:1-10.
2. Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y, Honjo H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83(1-5):149-155.
3. Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T et al. 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(3):514-519.
4. Bulun SE, Fang Z, Imir G et al. Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2004; 22(1):45-50.
5. Bulun SE, Gurates B, Fang Z et al. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002; 55(1-2):21-33.
6. Bulun SE, Imir G, Utsunomiya H et al. Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 95(1-5):57-62.
7. Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 2006; 12(1):49-56.
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(1-2):191-200.
9. Wu T, Leng J, Han C, Demetris AJ. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(3):299-307.
10. Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 2001; 16(3):561-566.
11. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002; 123(2):217-226.
12. Liu W, Ahmad SA, Reinmuth N et al. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 2000; 5(4):323-328.
13. Collins TS, Hurwitz HI. Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005; 32(1):61-68.
14. 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(3):379-387.
15. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baranao RI. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1beta and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18(9):1767-1771.
 16. Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grummer R. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005; 8(2):147-156.
 17. Jung YD, Liu W, Reinmuth N et al. Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 beta in human vascular smooth muscle cells via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Angiogenesis* 2001; 4(2):155-162.
 18. Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(3):269-275.
 19. Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2004; 31(2 Suppl 7):2-11.
 20. Johnson MC, Torres M, Alves A et al. 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.
 21. Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5):696-701.
 22. Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943:131-147.
 23. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74(4):760-766.
 24. Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77(6):1141-1147.
 25. Meresman GF, Bilotas M, Buquet RA, Baranao RI, Sueldo C, Tesone M. 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.
 26. Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, Ragni N. Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Surv* 2005; 60(12):817-826.
 27. Goss PE. Breast cancer prevention--clinical trials strategies involving aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86(3-5):487-493.
 28. Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003; 63(22):8037-8050.
 29. 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(2):459-463.
 30. 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(4):R422-R435.
 31. Jendrossek V, Handrick R, Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 2003; 17(11):1547-1549.
 32. 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(6):1609-1615.
 33. 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(3):265-271.
34. ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67(5):817-821.
35. Meresman GF, Baranao RI, Tenenbaum A, Singla JJ, Neuspiller NR, Rumi LS. Effect of peritoneal fluid from patients with mild and severe endometriosis on endometrial stromal cell proliferation. *Arch Gynecol Obstet* 1997; 259(3):109-115.
36. Abrams JM, White K, Fessler LI, Steller H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1993; 117(1):29-43.
37. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple *technique* for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 2005; 5:12.
38. Bradford MM. 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.
39. Abbas MM, Evans JJ, Sykes PH, Benny PS. Modulation of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in normal human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2004; 82 Suppl 3:1048-1053.
40. Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update* 2006; 12(2):179-189.
41. Fleming H. Structure and function of cultured endometrial epithelial cells. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17(1):93-106.
42. Kazanov D, Dvory-Sobol H, Pick M et al. Celecoxib but not rofecoxib inhibits the growth of transformed cells in vitro. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1 Pt 1):267-271.
43. Connolly EM, Harmey JH, O'Grady T et al. Cyclo-oxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *Br J Cancer* 2002; 87(2):231-237.
44. Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6):1089-1100.
45. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002; 123(2):217-226.
46. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000; 6(1):45-55.
47. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002; 62(3):625-631.
48. Wei D, Wang L, He Y, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. 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(6):2030-2038.
49. Ebert AD, Bartley J, David M. Aromatase inhibitors and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in endometriosis: new questions--old answers? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 122(2):144-150.

San Isidro

Unidad de Fertilidad San Isidro

Director: Dr. Claudio Ruhlmann

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

Ciudad de Buenos Aires

Centro de Reproducción Hospital Italiano



**Diagnóstico y tratamiento
de la pareja estéril.
Endoscopía en reproducción.
Fertilización asistida de alta y
baja complejidad.
Aborto habitual.**

Jefe de Servicio: Dr. Roberto Testa
Jefe de Sección Reproducción: Dr. Sebastián Gogorza

Gascón 450 – Capital
Tel-Fax: (054) 4958-4546
gineco@hospitalitaliano.org.ar