

Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis

Carla Olivares, Mariela Bilotas, Ricardo Buquet, Mario Borghi, Carlos Sueldo, Marta Tesone, Gabriela Meresman

Human Reproduction 2008,1–8.
Reproducción 2009;24:199-201

Summary

Background. Celecoxib, a selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor, also has anti-proliferative properties and pro-apoptotic effects on different *in vivo* and *in vitro* models, two actions that may be efficacious in therapy for endometriosis. We evaluated the effects of celecoxib on apoptosis and proliferation, and vascular endothelial growth factor (VEGF) production and COX-2 expression and activity in endometrial epithelial cells (EECs). **Methods and results.** Thirty-two endometriosis and 13 control women were included in the study. EECs from eutopic endometrium and control biopsies were cultured with different doses of celecoxib. Celecoxib at 50, 75 and 100 mM (versus vehicle control) inhibited EEC proliferation in cultures from controls ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.01$, respectively) and patients with endometriosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.01$), as assessed by ^3H -thymidine uptake. Celecoxib at 50, 75 and 100 mM induced apoptosis in EEC from controls ($P < 0.05$, $P < 0.001$ and $P < 0.001$) and patients with endometriosis ($P < 0.001$, $P < 0.001$ and $P < 0.01$), as revealed by the Acridine Orange–Ethidium Bromide technique. Western blot analysis showed that celecoxib was effective at increasing COX-2 protein at 100 mM in EEC from endometriosis patients ($P < 0.05$). In EEC from endometriosis patients, celecoxib at 25, 50 and 100 mM was also effective in reducing COX-2 activity, reflected in the reduction of prostaglandin E2 (PGE2) synthesis ($P < 0.001$), and VEGF secretion ($P < 0.001$; $P < 0.05$ and $P < 0.001$), assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. Exogenous

PGE2 did not reverse celecoxib-induced growth inhibition. **Conclusions.** This study suggests a direct effect of celecoxib on reduction of endometrial growth and supports further research on selective COX-2 inhibition as a novel therapeutic modality in endometriosis.

Efecto de un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 sobre las células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis

Resumen

Antecedentes. Se ha observado que el celecoxib, un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa (COX)-2, posee propiedades anti-proliferativas y efectos pro-apoptóticos en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*, dos acciones que pueden ser eficaces en la terapia de la endometriosis. Evaluamos los efectos del celecoxib sobre la apoptosis y la proliferación celular, la producción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y la expresión y actividad de COX-2 en cultivos de células epiteliales endometriales (CEEs). **Métodos y resultados.** En este trabajo se incluyeron 32 mujeres con endometriosis y 13 controles. Se cultivaron las CEEs provenientes de endometrio eutópico provenientes de pacientes con endometriosis y controles con diferentes dosis de celecoxib. La proliferación celular se evaluó por la incorporación de ^3H -timidina y se observó que celecoxib a 50, 75 y 100mM inhibió la proliferación de las CEEs tanto en los cultivos provenientes de controles ($p < 0.05$, $p < 0.01$

y $p < 0.01$ respectivamente) como en pacientes con endometriosis ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.01$), (versus vehículo como control). Por otro lado, el celecoxib en concentraciones de 50, 75 y 100mM indujo apoptosis en las CEEs provenientes tanto de controles ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.01$) como de pacientes con endometriosis ($p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p < 0.01$), evaluado por la técnica de naranja de acridina-bromuro de etidio. El análisis de los *Western Blot* mostró que el celecoxib 100mM fue efectivo en aumentar la expresión de la proteína COX-2 en las CEEs de las pacientes con endometriosis ($p < 0.05$). Asimismo, en estos cultivos el celecoxib a 25, 50 y 100mM fue efectivo en reducir la actividad de COX-2, que se reflejó en la reducción de la síntesis de la prostaglandina E_2 (PGE_2) ($p < 0.001$) y en inhibir la secreción de VEGF ($p < 0.001$, $p < 0.005$ y $p < 0.001$), ambas concentraciones determinadas por medio de ensayos de ELISA. La inhibición del crecimiento inducida por celecoxib no se revirtió con PGE_2 exógena. **Conclusiones.** Este estudio sugiere un efecto directo del celecoxib en la reducción del crecimiento endometrial y apoya futuras investigaciones sobre la inhibición selectiva de COX-2 como novel modalidad terapéutica en la endometriosis.

Comentario de los autores

La endometriosis es una enfermedad común en mujeres en edad reproductiva, especialmente en aquellas consideradas infértiles, donde la incidencia alcanza niveles del 30-40 %. La mayoría de las pacientes con endometriosis acuden a la consulta presentando dolor pélvico y/o infertilidad.

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. Dada esta situación, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes y que acarreen menos efectos colaterales es constante.

En los últimos años se ha descrito una serie de mecanismos interrelacionados que actúan a nivel del endometrio eutópico y ectópico en pacientes con endometriosis, y que finalizan con una pro-

ducción estrogénica local incrementada. Existe un consenso generalizado sostenido por la contundencia de los hallazgos experimentales que indican que en las lesiones endometriósicas se observa una expresión y una actividad de aromatasa P450 aumentada, lo que estaría causando una producción local incrementada de estrógenos. Asimismo, se conoce una demostrada interacción entre aromatasa y la cascada prostaglandínica en las lesiones endometriósicas; los estrógenos estimulan la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) y por lo tanto incrementan la producción de prostaglandina E_2 (PGE_2), reconocido mediador del proceso inflamatorio. A su vez, la PGE_2 estimula la acción de la aromatasa y la secreción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). Estos efectos cierran un círculo vicioso perjudicial en pacientes con endometriosis ya que los estrógenos también inducen la secreción del factor pro-angiogénico VEGF en las células endometriales.

Este circuito productor de estrógenos a nivel de las lesiones se vería agravado por la presencia de una demostrada deficiencia de 17 beta-hidroxiesteroide-deshidrogenasa Tipo II (17β HSD tipo II), enzima responsable de convertir el estradiol a estrona (un estrógeno significativamente menos activo). La combinación de estas dos anomalías (la aumentada expresión de aromatasa y la deficiencia relativa de la 17β HSD Tipo II), ayuda a mantener altos niveles de estrógenos potentes a nivel de las lesiones endometriósicas. De esta manera se genera una regulación positiva que conlleva a la inflamación local, proliferación celular y angiogénesis de las lesiones endometriósicas.

El inhibidor selectivo de COX-2, celecoxib, está siendo últimamente evaluado por sus efectos inhibitorios de la progresión tumoral. Específicamente, han sido descritos efectos anti-angiogénicos (inhibe la secreción de VEGF), anti-proliferativos y pro-apoptóticos tanto *in-vitro*, *in-vivo*, como en numerosos ensayos clínicos actualmente en curso. Celecoxib es el único AINE que está actualmente aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes que sufren de poliposis adenomatosa familiar. Recientemente se han descrito los mecanismos moleculares implicados en la inducción de la apoptosis por parte de celecoxib. Asimismo, se ha propuesto que celecoxib poseería un efecto sinérgico con inhibidores de aromatasa

Trabajos argentinos publicados en el exterior

en el tratamiento del cáncer de mama. A pesar de que el celecoxib es utilizado 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.

Por todo lo expuesto, este trabajo tiene como

objetivo contribuir a dilucidar los mecanismos involucrados en la inhibición del crecimiento endometrial por parte de novedosas alternativas terapéuticas consideradas para el tratamiento de la endometriosis: el inhibidor selectivo de COX-2, celecoxib.

Effect of a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Inhibitory Treatment on the Folliculogenesis and Ovarian Apoptosis in Gonadotropin-Treated Prepubertal Rats¹

Dalhia Abramovich,³ Fernanda Parborell,³ Marta Tesone

BIOLOGY OF REPRODUCTION 2006;75:434-441.

Reproducción 2009;24:201-203

Summary

In the present study, we investigated whether vascular endothelial growth factor A (VEGFA) plays a critical intraovarian survival role in gonadotropin-dependent folliculogenesis. The effect of an intrabursal administration of a VEGFA antagonist on follicular development, apoptosis, and levels of pro- and antiapoptotic proteins of BCL2 family members (BAX, BCL2, and BCL2L1), as well as of TNFRSF6 (also known as FAS) and FAS ligand (FASLG), was examined. To inhibit VEGFA, a soluble FLT1/Fc Chimera (Trap) was administered to prepubertal eCG-treated rats. Injection of 0.5 lg of Trap per ovary did not change the number of preantral follicles (PFs) or early antral follicles (EAFs); however, it significantly decreased the number of periovulatory follicles 48 h after surgery and significantly increased the number of atretic follicles. No significant differences were found in any stage of the follicles either 12 or

24 h after injection. Cells undergoing DNA fragmentation were quantified by performing TUNEL on ovarian sections. Trap treatment caused a twofold increase in the number of apoptotic cells in EAFs. DNA isolated from antral follicles incubated for 24 h exhibited the typical apoptotic DNA pattern. Follicles obtained from Trap-treated ovaries showed a significant increase in the spontaneous onset of apoptotic DNA fragmentation. The injection of Trap significantly increased the levels of BAX and decreased the levels of BCL2 protein. The ratio of BCL2L1L:BCL2L1s was significantly diminished in follicles obtained from ovaries treated with Trap. No changes in the levels of TNFRSF6 or FASLG were observed after treatment. We concluded that the local inhibition of VEGFA activity appears to produce an increase in ovarian apoptosis through an imbalance among the BCL2 family members, thus leading a larger number of follicles to atresia

Efecto de un tratamiento inhibitorio del factor de crecimiento vascular endotelial VEGF en la foliculogénesis y la apoptosis ovárica en ratas prepuberales tratadas con gonadotrofinas

Resumen

En el presente estudio investigamos si el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFA) juega un rol de supervivencia crítico intraovárico en la foliculogénesis dependiente de gonadotrofinas. Se examinó el efecto de una administración intrabursa de un antagonista del VEGFA en el desarrollo folicular, apoptosis y niveles de proteínas pro- y antiapoptóticas de la familia BCL2 (BAX, BCL2 y BCL2L 1), así como de TNFRSF6 (también conocido como FAS) y FAS-ligando (FASLG). Para inhibir el VEGFA se administró FLT1/Fc Chimera (Trap) en forma soluble a ratas prepuberales tratadas con GCe (gonadotrofina coriónica equina). La inyección de 0,5/g de Trap por ovario no cambió el número de folículos antrales (EAFs); sin embargo, disminuyó significativamente el número de folículos periovulatorios 48hs después de la cirugía y aumentó significativamente el número de folículos atrésicos. No se encontraron diferencias significativas en ningún estadio de los folículos ni 12 ni 24 hs después de la inyección. Las células que experimentaban fragmentación del ADN se cuantificaron por técnica de TUNEL en secciones ováricas. El tratamiento con Trap causó un aumento al doble del número de células apoptóticas en los EAFs. El ADN aislado de los folículos antrales incubado por 24hs exhibió el patrón típico de ADN apoptótico. Los folículos obtenidos de los ovarios tratados con Trap mostraron un aumento significativo del inicio espontáneo de fragmentación apoptótica de ADN. La inyección de Trap aumentó significativamente los niveles de BAS y disminuyó los niveles de la proteína BCL2. La relación BCL2L:BCL2L1 disminuyó significativamente en los folículos obtenidos de ovarios tratados con Trap. No se observaron cambios en los niveles de TNFRSF6 o FASLG luego del tratamiento. Concluimos que la inhibición local de la actividad del VEGFA parece producir un aumento en la apoptosis ovárica a través de un desba-

lance entre los miembros de la familia BCL2, llevando, por lo tanto, a la atresia a un mayor número de folículos.

Comentario de la Dra Dahlia Abramovich

La angiogénesis ha sido ampliamente estudiada en condiciones patológicas, principalmente debido a que está aumentada en cáncer y otras enfermedades.¹ En el adulto la angiogénesis es infrecuente en condiciones fisiológicas y el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población estable y de baja tasa mitótica.² Se observa angiogénesis principalmente en procesos de reparación de tejidos como cicatrización de heridas y fracturas. Diversas patologías se asocian tanto a una excesiva tasa mitogénica de las células endoteliales (crecimiento tumoral, retinopatías, hemangiomas, artritis reumatoidea, fibrosis, etc)^{2,3} como a una disminución en la angiogénesis normal (retraso en cicatrización de heridas, úlceras varicosas crónicas, falta de cicatrización de fracturas).³

Sin embargo, se observa angiogénesis fisiológica en el tracto reproductor femenino, como por ejemplo en la placenta, la implantación y los cambios cíclicos que ocurren en ovario y endometrio.⁴ Los tejidos del sistema reproductor femenino adulto presentan una alta tasa mitogénica solo comparable al crecimiento tumoral.⁵ Sin embargo, a diferencia de los procesos tumorales, el crecimiento de estos tejidos ocurre en forma limitada y altamente ordenada.

En el ovario el aporte vascular se produce en forma cíclica. La angiogénesis se encuentra regulada independientemente en cada uno de los folículos individuales y, dependiendo de la extensión del plexo vascular y de la permeabilidad de sus vasos, se puede controlar el suministro de factores tróficos de alto peso molecular, precursores y lípidos. Esto indicaría que los vasos sanguíneos foliculares estarían directamente involucrados en los procesos de selección, dominancia y atresia.⁶

Debido a que el proceso de formación y regresión de los vasos sanguíneos en el ovario se produce en forma cíclica y que es imprescindible para una correcta función reproductiva, la angiogénesis ovárica está estrictamente regulada. La regulación está gobernada principalmente por factores angiogénicos. El principal factor involu-

Trabajos argentinos publicados en el exterior

crado en la regulación de la angiogénesis ovárica es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF o VEGFA). Existe amplia evidencia que el VEGFA, además de su función angiogénica, es un factor de supervivencia para células endoteliales tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas BCL2, survivina y XIAP, y activa la vía de señalización de PI3K/Akt.⁷⁻¹⁰

Los defectos en la angiogénesis ovárica pueden contribuir a una variedad de desórdenes como la anovulación e infertilidad, la pérdida de embarazo, el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS), la poliquistosis ovárica (PCOS) y neoplasmas ováricos. El OHSS es una complicación causada por protocolos de estimulación ovárica en técnicas de reproducción asistida (ART) que en algunos casos puede tener resultados fatales. Las características de la enfermedad involucran: aumento en el tamaño del ovario, sobreproducción de hormonas esteroideas y sustancias como citoquinas, angiotensina y el VEGFA, contribuyendo de esta manera al aumento de permeabilidad vascular y formación de quistes. El VEGFA es el principal candidato involucrado en la patogénesis de OHSS.¹¹⁻¹³ También se ha observado en pacientes con PCOS que los niveles del VEGFA están aumentados en suero.¹⁴ Las manifestaciones endócrinas de esta enfermedad incluyen altos niveles de andrógenos, quistes foliculares y anovulación.¹⁵

Es por esta razón que decidimos estudiar el rol que cumple el VEGFA en el ovario de rata en relación al desarrollo y la atresia folicular mediada por apoptosis de las células del folículo. Postulamos que el VEGFA juega un rol crítico en la foliculogénesis dependiente de gonadotrofinas y para ello, en este trabajo, evaluamos el efecto de la administración local de un inhibidor del VEGFA sobre el desarrollo folicular, la apoptosis y la expresión de diversas proteínas pro y antiapoptóticas de la familia de BCL-2 como también FAS y FASL.

Observamos que la inhibición del VEGFA produce un aumento en la apoptosis ovárica a través de un desbalance en la relación de proteínas pro y antiapoptóticas llevando a un mayor número de folículos a la atresia. Postulamos que el mecanismo sería a través de una disminución en la vasculatura o a través de la inhibición de la interacción del VEGFA con su receptor presente en las células de la granulosa.

El importante rol del VEGFA en el ovario lleva a que una alteración en su producción cause diversos desórdenes relacionados a la muerte celular programada de las células del folículo. Los resultados de este trabajo podrían contribuir a un mayor conocimiento de los mecanismos por los cuales el VEGFA produce alteraciones como las observadas en el OHSS y PCOS. Además, el uso de inhibidores de la angiogénesis podría considerarse como una nueva posible estrategia terapéutica para estas alteraciones.

Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA, Cell 2000;100:57-70.
2. Klagsbrun M, D'Amore PA. Cytokine Growth Factor Rev 1996;7:259-270.
3. Folkman J, Klagsbrun M. Science 1987;235:442-447.
4. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Arch. Med. Res 2001;32:567-575.
5. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA. Prog. Growth Factor Res 1994;5:159-175.
6. Fraser HM. Reprod. Biol Endocrinol 2006;4:18.
7. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. J Biol Chem 1998; 273:13313-13316.
8. Gerber HP et al. J Biol Chem 1998;273:30336-30343.
9. Fujio Y, Walsh K, J Biol Chem 1999;274:16349-16354.
10. Tran J, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:4349-4354.
11. McClure N, et al. Lancet 1994;344:235-236.
12. Abramov Y, Barak V, Nisman B, Schenker JG. Fertil Steril 1997;67:261-265.
13. McElhinney B, Ardill J, Caldwell C, Lloyd F, McClure N, Fertil Steril 2002;78:286-290.
14. Agrawal R, et al. Hum Reprod 1998;13:651-655.
15. Azziz R, et al. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2745-2749.