

## **Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina.**

*Gabriela Meresman.*

Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Palabras clave:** apoptosis, ovario, glándula mamaria, endometrio, endometriosis.

**Resumen.** La apoptosis es un proceso genéticamente controlado mediante el cual las células inducen su propia muerte. Mensualmente y en forma cíclica, el ovario, el endometrio y la glándula mamaria atraviesan por ciclos de proliferación celular y apoptosis respondiendo a los cambios en la secreción hormonal. Durante el desarrollo embrionario, la apoptosis está implicada en procesos relacionados con la escultura de los diferentes órganos, a través de la eliminación de estructuras innecesarias y con el control de las células defectuosas. Asimismo, la apoptosis juega un papel fundamental en la función ovárica. La reserva folicular se establece durante la vida fetal y luego se va eliminando gradualmente. La apoptosis está involucrada tanto en la muerte celular durante el proceso de reclutamiento del folículo dominante, como en la luteólisis. Durante la pubertad la apoptosis contribuye a la formación del espacio luminal de los ductos terminales de la mama. A su vez, el proceso de involución mamaria luego de la lactancia se caracteriza por una apoptosis masiva de las células epiteliales secretoras. Así como la apoptosis está involucrada en los cambios fisiológicos que ocurren a nivel endometrial, también se ha asociado a la muerte celular programada con procesos patológicos, especialmente en aquellos caracterizados por el incremento en el crecimiento celular como es el caso de la endometriosis. El delicado balance entre la apoptosis y la proliferación celular es fundamental ya que permite que los tejidos puedan responder en forma cíclica a los cambios hormonales fisiológicos y prevenir procesos de transformación neoplásica.

**Relevance of apoptosis in the female reproductive system.***Invest Clin 2011; 52(3): 274 - 290***Key words:** apoptosis, ovary, mammary gland, endometrium, endometriosis.

**Abstract.** Apoptosis is a genetically controlled form of cell suicide. Due to the cyclic nature of the female reproductive system, the ovary, the endometrium and the mammary gland sustain continuous cycles of cell growth and apoptosis in response to hormonal changes. Apoptotic cell death plays multiple roles during embryonic and organ development. It is involved in sculpturing tissues and serves to delete structures that are no longer required. It is clear that apoptosis plays an active and important role in ovarian physiological functions. Apoptosis plays a major role during folliculogenesis and dominant follicle selection and also plays part in *corpus luteum* regression. In addition, it has been shown that programmed cell death plays important roles in the mammary gland development and ductal morphogenesis. During puberty, lumen formation is associated with the selective apoptosis of centrally located cells. In turn, postlactational involution of the mammary gland is characterized by the secretory epithelial cells undergoing programmed cell death. Apoptosis has also been associated with physiological, as well as pathological, endometrial processes such as cancer and endometriosis. The delicate balance between apoptosis and cell proliferation is essential in controlling the cyclical growth of the reproductive tissues and plays an important role in the prevention of neoplastic transformation.

*Recibido:26-11-2010. Aceptado:14-04-2011*

**INTRODUCCIÓN**

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso genéticamente controlado mediante el cual las células inducen su propia muerte. Este evento puede ser desencadenado tanto por estímulos extrínsecos como intrínsecos, es propio de los organismos multicelulares desde los parásitos hasta los seres humanos, y conduce a la eliminación de células que se producen en exceso, que se han desarrollado en forma impropia o que acarrearán algún daño genético (1). De ahí que se considere a la muerte celular programada como un proceso fisiológico que contribuye a la construcción y al mantenimiento de los tejidos.

A lo largo de la vida de un organismo, la apoptosis participa desde el desarrollo hasta la senescencia. El delicado equilibrio entre proliferación celular y apoptosis asegura un correcto control sobre la homeostasis de los tejidos. Sin embargo una falla en ese balance dada tanto por niveles de apoptosis aumentados como disminuidos puede disparar procesos patológicos tales como el cáncer, sida o autoinmunidad (2).

En los últimos años, el proceso de apoptosis ha suscitado el interés de numerosos investigadores y ha sido objeto de diversas investigaciones que se han visto reflejadas en un aumento exponencial del número de publicaciones científicas (3).

El sistema reproductor femenino representa un excelente modelo para el estudio de la remodelación constante de los tejidos. Mensualmente y en forma cíclica, el ovario, el endometrio y la glándula mamaria atraviesan ciclos de proliferación celular y apoptosis respondiendo a los cambios en la secreción hormonal. Estos ciclos de crecimiento y muerte juegan un papel importante no sólo en la fisiología normal de los tejidos, si no también en la prevención de la transformación neoplásica e inicio del cáncer.

En esta actualización se resumen los aspectos más relevantes de las implicaciones de la apoptosis en la fisiopatología del aparato reproductor femenino y en el desarrollo del embrión en sus primeras etapas.

#### **APOPTOSIS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES**

A la hora de deshacerse de células potencialmente riesgosas o simplemente que están en exceso, los organismos multicelulares ponen en marcha la maquinaria de apoptosis. Esta consiste en un proceso activo y genéticamente controlado que culmina con la destrucción de la célula.

La apoptosis es un proceso altamente complejo que involucra una secuencia de señalización intracelular a través de diversas proteínas y factores reguladores, algunos inhibidores y otros inductores de la muerte. En esta revisión, se resumen los aspectos más relevantes de este proceso, limitándose a nombrar sólo las vías de regulación más destacadas con el consiguiente riesgo de simplificar lo complejo.

La ejecución del programa de muerte se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos, que incluye entre otros la contracción celular, la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, la conden-

sación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de vesículas rodeadas de membrana con organelas intactas, llamadas cuerpos apoptóticos (4).

Es importante destacar que, a diferencia de la necrosis, la membrana de las células apoptóticas permanece intacta hasta las últimas etapas, sin liberar el contenido citoplasmático y por consiguiente, sin generar inflamación local (Tabla I).

Estos cambios se producen como consecuencia de la activación de dos grandes y complejas vías de señalización intracelular: la vía extrínseca, mediada por receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas convergen en unas proteínas efectoras características llamadas caspasas y culminan en la destrucción programada de la célula (5). Luego, las células apoptóticas son rápidamente eliminadas por el sistema inmune sin mediar procesos inflamatorios.

Las caspasas forman una familia de proteasas homólogas entre sí y altamente conservadas en la evolución. Son cisteína proteasas específicas de ácido aspártico. Las caspasas se expresan como proenzimas sin actividad biológica y tienen que activarse para poder ejercer su acción. Estas procaspasas poseen la habilidad de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación. Participan tanto de la iniciación como de la ejecución del proceso de apoptosis. En las etapas finales de la apoptosis, la ruptura controlada del ADN es llevada a cabo por endonucleasas que se activan por vía de las caspasas (6).

La vía extrínseca o vía de receptores involucra a la familia de receptores y ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF) entre los cuales se encuentra Fas o CD95, que es el receptor de muerte más estudiado y relevante. La unión de Fas con su ligando FasL (o CD95L) es requerida para la transducción de la señal apoptótica. Luego de este evento, una serie de proteínas intrace-

**TABLA I**  
PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE APOPTOSIS Y NECROSIS

Necrosis	Apoptosis
Pérdida de la integridad de membrana y liberación del contenido celular	No hay pérdida de integridad membrana
Floculación de la cromatina	Agregación de la cromatina en la membrana nuclear interna
Dilatación de la célula y lisis	Condensación y/o reducción celular
No hay formación de vesículas, lisis completa	Formación de vesículas limitadas por membrana (cuerpos apoptóticos)
Desintegración de organelas (por dilatación)	No hay desintegración de organelas, permanecen intactas
No requiere energía (proceso pasivo)	Requiere ATP (proceso activo)
Digestión del DNA al azar	Fragmentación del DNA en mono- y oligonucleosomas
Muerte de grupos de células	Muerte de células individuales
Originada por estímulos no fisiológicos	Inducida por estímulos fisiológicos
Fagocitosis por macrófagos	Fagocitosis por macrófagos
Respuesta inflamatoria	NO hay respuesta inflamatoria

lulares se asocia con el Fas activado para formar el complejo de señalización inductor de muerte (death-inducing signalling complex, DISC).

Primero, la molécula adaptadora FADD (Fas-associated death domain) se une a través de su dominio de muerte al Fas y luego, este complejo recluta a la procaspasa-8. Esta unión da lugar a la proteólisis de la procaspasa-8 que es activada y liberada del DISC al citoplasma. La caspasa-8 activa inicia la denominada cascada de caspasas, al procesar a la procaspasa-3, lo que resulta en su activación y otorga la señal a endonucleasas para la ejecución de la muerte celular (7) (Fig. 1).

Por otro lado, la vía intrínseca de señalización intracelular disparada por eventos tales como daño al ADN por tóxicos o por radiación, es también denominada vía mitocondrial. La mitocondria es fundamental en el proceso de apoptosis ya que una gran variedad de eventos clave están focalizados en

esta organela. La mayoría de los mecanismos apoptóticos que tiene lugar en la mitocondria está regulada por el equilibrio entre los miembros de la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas y el citocromo-c son los componentes más importantes involucrados en la vía mitocondrial.

La familia de Bcl-2 consta de 19 miembros, algunos de los cuales poseen actividad anti-apoptótica como el Bcl-2 y Bcl-XL y otros tienen actividad pro-apoptótica, como el Bax, el Bcl-xL y el Bcl-xS. La activación de proteínas pro-apoptóticas produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal; entre ellas, el citocromo-c (8, 9).

En caso de concretarse la salida del citocromo-c, este se asocia con la molécula adaptadora Apaf-1 y con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 que se convierte en caspasa-3 activa y se encarga de desenca-

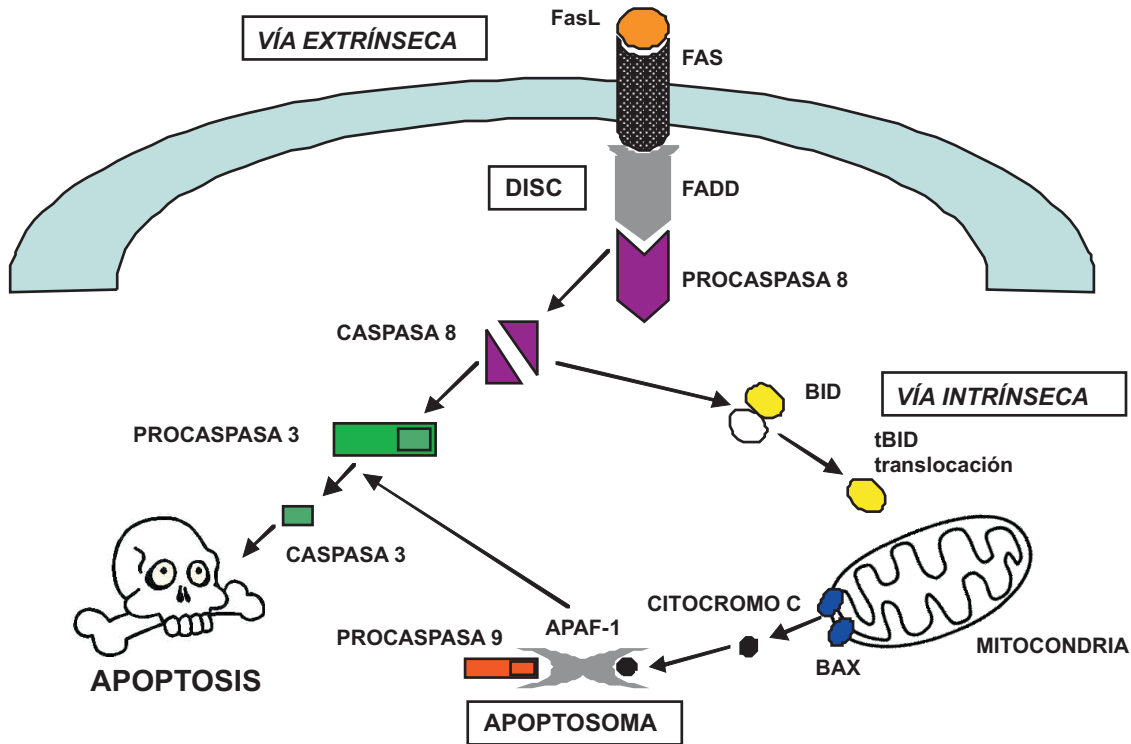


Fig. 1. Vías extrínseca e intrínseca de señalización intracelular de apoptosis. La unión de Fas con su ligando FasL inician la vía extrínseca mientras que la activación de proteínas mitocondriales como Bax produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación del citocromo-c dando lugar al inicio de la vía intrínseca de señalización de apoptosis. La vía extrínseca y la vía intrínseca pueden converger en la activación de la caspasa-3 por medio de la hidrólisis y translocación de Bid.

denar las últimas fases de la apoptosis (8, 9) (Fig. 1).

Asimismo, la vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial pueden converger en la activación de la caspasa-3. El solapamiento y la integración de las dos vías se dan a nivel de Bid, que es un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la hidrólisis de Bid lo cual resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo-c, la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-3 (5, 10). De esta manera, dependiendo el estímulo y del tipo celular, la activación de la apoptosis se puede producir ya sea por medio de la vía intrínseca, por medio de la vía extrínseca o a través de ambos caminos moleculares (Fig. 1).

### IMPORTANCIA DE LA APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

La primera evidencia de una base genética de la apoptosis se debió a estudios en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Durante la ontogenia de este gusano hermafrodita, 131 de las 1090 células somáticas mueren por apoptosis, dejando un adulto de 959 células. Un estudio genético en mutantes defectuosos de muerte celular identificó genes específicos para la regulación, ejecución y resolución de la apoptosis. Esta maquinaria básica de muerte celular está altamente conservada a través de la evolución. Se han hallado proteínas homólogas a las de *C. elegans* en *Drosophila* y en mamíferos (11).

Si bien, el *C. elegans* es un excelente modelo y abrió caminos para muchos descubrimientos en el campo de la apoptosis, estudiar la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario en organismos más evolucionados, es experimentalmente complejo. A pesar de que se sabe que la apoptosis es un evento fundamental en las etapas tempranas del desarrollo de diversos organismos multicelulares, la complejidad de su estudio en un modelo experimental adecuado, lleva muchas veces a subestimar sus niveles.

Sin embargo, se puede suponer la importancia que posee este fenómeno dado que la inhibición del proceso de apoptosis altera el desarrollo de tal forma, que en muchos casos, el animal no es viable.

Durante el desarrollo embrionario la apoptosis está implicada en distintos procesos relacionados con la escultura de las estructuras. El ejemplo más claro en vertebrados superiores es la eliminación de las membranas interdigitales para la formación de los dedos. Otro proceso de formación de estructuras en que esta involucrada la apoptosis es en el vaciado de cuerpos sólidos para crear una luz. Por ejemplo, en el embrión de ratón, la formación de la cavidad preamniótica es inducida por la muerte de células ectodermales de su interior (12).

Asimismo, durante el desarrollo, se relaciona el proceso de apoptosis con la eliminación de estructuras innecesarias en algún estadio de la evolución o para algún sexo en particular. En el desarrollo del sistema reproductor de los mamíferos, la apoptosis es responsable de la eliminación de los ductos de Müller que forman el útero y los oviductos en machos de mamíferos y de los ductos de Wolff en hembras (13). Otro ejemplo clásico de inducción de apoptosis durante el desarrollo es la pérdida de la cola durante la metamorfosis de los renacuajos en respuesta al incremento de una hormona tiroidea (12).

El control de las células defectuosas es también fundamental. Durante las etapas de desarrollo temprano, se eliminan por apoptosis células anormales, con localización errónea, no funcionales o potencialmente peligrosas.

### IMPORTANCIA DE LA APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR

En los seres humanos, la reserva folicular se establece durante la vida fetal y luego el número de folículos va disminuyendo gradualmente (14). La apoptosis juega un papel fundamental en el desarrollo y en la funcionalidad del ovario.

Durante la etapa fetal temprana se forman en el ovario aproximadamente  $7 \times 10^6$  ovocitos. Este número se reduce drásticamente antes del nacimiento por la muerte por apoptosis después de las 20 semanas de gestación. Por lo menos dos tercios de los ovocitos de la reserva mueren por apoptosis en la etapa prenatal. Al nacer, solo quedan en el ovario de uno a dos millones de ovocitos, y durante la pubertad sólo se dispone para la ovulación de 300.000 de los siete millones de ovocitos originales y de estos, solo ovularán de 400 a 500. Por lo tanto a lo largo de la vida reproductiva femenina, entre los períodos de pubertad y menopausia, unos 250.000 folículos estarán destinados a morir. Luego de la ovulación, el folículo dominante formará el cuerpo lúteo, y la apoptosis también es responsable de su regresión o luteólisis (13, 15) (Fig. 2).

El desarrollo folicular es un proceso dinámico que prosigue desde la menarquia hasta la menopausia. Tiene como finalidad permitir el reclutamiento mensual de una cohorte de folículos y, por último, la selección de un solo folículo maduro dominante capaz de ovular.

Durante la etapa folicular primordial, poco después del reclutamiento inicial, la

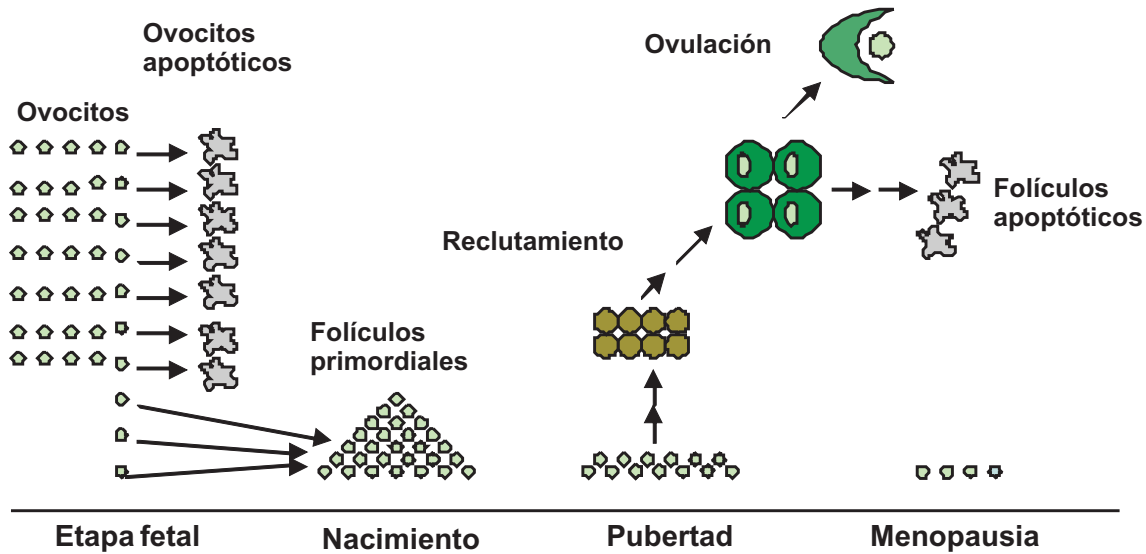


Fig. 2. Apoptosis durante el desarrollo folicular. De los 7 millones de ovocitos que se producen durante la etapa fetal, la gran mayoría muere por apoptosis antes del nacimiento. Al nacer, solo quedan en el ovario de uno a dos millones de ovocitos, y durante la pubertad solo se dispone para la ovulación de 300.000, de los cuales sólo ovularán de 400 a 500, el resto estarán destinados a morir por apoptosis.

FSH controla la diferenciación y el crecimiento de los folículos. Durante la selección de folículos para su reclutamiento, la FSH permite que algunos folículos antrales escapen a su destino de muerte por apoptosis. Luego, el folículo dominante comienza a segregarse elevados niveles de estrógenos e inhibina que reducen la liberación de FSH. Esta acción resulta en una selección negativa de los folículos remanentes en la cohorte, lo que permite que estos terminen eliminándose por apoptosis. Asimismo, la producción de determinados factores de crecimiento permite la selección positiva del folículo dominante y su ovulación (16, 17).

Con el fenómeno de luteólisis o regresión del cuerpo lúteo se cierra el ciclo menstrual femenino. La luteólisis es un proceso funcional y morfológico que se inicia cuando decaen los niveles de progesterona. El cuerpo lúteo involucrena en el ovario y en este proceso se han hallado distintas moléculas involucradas en la apoptosis: TNF, Fas/FasL y caspasa-3. Asimismo se ha asociado a la luteólisis con alteraciones en la

expresión de la relación Bcl-2/Bax, lo que confirma un papel fundamental de la apoptosis en este proceso (17, 18).

En síntesis, la apoptosis está involucrada tanto en la muerte folicular durante el proceso de reclutamiento del folículo dominante, como en la luteólisis. La comprensión de la importancia de la apoptosis en la fisiopatología ovárica podría resultar beneficiosa en el control de ciertas enfermedades. La inducción de apoptosis podría ayudar a controlar el proceso de malignidad de los tumores de ovario. Asimismo se están desarrollando potenciales estrategias terapéuticas para combatir las fallas ováricas prematuras con el consiguiente beneficio sobre la capacidad reproductiva de la pareja (15, 19).

### CONTRIBUCIÓN DE LA APOPTOSIS AL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La mayor parte del desarrollo de la glándula mamaria ocurre en la etapa post-natal. En condiciones normales la

mama no se desarrolla hasta la pubertad, cuando recibe el estímulo de las hormonas sexuales femeninas. Durante la pubertad, la apoptosis contribuye a la formación del espacio luminal de los ductos terminales (20, 21).

Asimismo durante cada ciclo menstrual, la glándula mamaria adulta está expuesta a fluctuaciones hormonales periódicas. El epitelio glandular mamario responde a estos cambios atravesando por etapas de proliferación, diferenciación y muerte celular por apoptosis. Durante la fase folicular tardía las células de la glándula mamaria responden a los elevados niveles de estrógeno proliferando activamente y diferenciándose limitadamente (22). En ausencia de embarazo, finalizando el ciclo menstrual, una alta proporción de esas células epiteliales sufre apoptosis, asegurando de esta manera la homeostasis del tejido (20, 23).

Se ha identificado la expresión máxima de Bcl-2 en la glándula mamaria durante la fase folicular y de Bax, durante la fase lútea, lo que sugiere que la vía intrínseca está implicada en la regulación de este proceso (24). Por otro lado, se ha observado que en la formación del lumen de los ductos terminales están implicadas las vías extrínseca e intrínseca de señalización intracelular así como la autofagia (25).

Durante el embarazo, el aumento en los niveles de estrógeno y progesterona estimula el desarrollo glandular. Las mamas tienden a hacerse esféricas debido al aumento del tejido adiposo. En este periodo las mamas se vuelven turgentes y aumentan de tamaño.

La lactancia tiende a mantener los cambios ocurridos durante el embarazo. Durante estas etapas se produce una proliferación y diferenciación masiva de las células epiteliales de la glándula mamaria. Sin embargo, esa capacidad de crecimiento natural sin una correcta programación del sistema de diferenciación y muerte, podría lle-

var a la aparición del cáncer. Esta posibilidad es evitada por el cese de la lactancia, iniciándose un proceso de regresión del epitelio secretor denominado *involución*.

La involución mamaria puede subdividirse en dos etapas: una primera fase caracterizada por apoptosis masiva de las células epiteliales secretorias; y una segunda, caracterizada por una remodelación estructural de la mama (20, 23). A su vez, se ha sugerido que la primera etapa de la involución puede subdividirse en dos estadios, un estadio de iniciación, en el cual la apoptosis se desencadena por los receptores de muerte y otro estadio tardío, que estaría regulado por la vía intrínseca de apoptosis (23).

Los receptores de muerte y sus ligandos están involucrados en la involución mamaria. El FasL se expresa en la glándula mamaria durante la preñez y la lactancia pero no lo hace en la mama de ratones vírgenes. Por el contrario, su receptor Fas se expresa en la glándula mamaria de ratones vírgenes pero se halla ausente durante la lactancia (26).

Dado que la interacción entre Fas y su ligando es necesaria para la activación de caspasas y el inicio de la apoptosis, la desconexión temporal de la expresión de estas proteínas durante la lactancia, la preñez y en la mama de ratones vírgenes sugiere que el proceso de apoptosis en esas etapas está inactivo.

Sin embargo, a partir del primer día de la involución, Fas y FasL coinciden y su expresión aumenta marcadamente, por lo que se estaría estimulando a la vía extrínseca e induciendo a la apoptosis durante esta etapa. No obstante, se sabe que esta vía no sería la única implicada en la muerte celular durante la involución mamaria ya que su ausencia sólo retrasa el proceso de involución pero no lo suprime (26).

Distintos estudios han demostrado que las caspasas iniciadoras y efectoras están in-



volucradas en la involución mamaria post-lactancia (27). Se ha observado también que tanto el Bax como el Bak y el Bcl-xS todas proteínas pro-apoptóticas, están implicadas en la regulación de la apoptosis de esta etapa (28).

De todo lo expuesto se puede deducir que tanto la vía extrínseca como la intrínseca están involucradas en la muerte por apoptosis que ocurre durante la involución mamaria. Se han identificado distintos estímulos que disparan este proceso, sugiriendo que la regulación de la apoptosis durante la involución es multifactorial e implica la yuxtaposición de varias vías de señalización. La inhibición de una de estas vías, no aborta por completo el proceso pues la importancia del retorno de la mama al estadio pre-preñez es primordial, por lo cual la involución está asegurada por la redundancia de distintos mecanismos de regulación (20).

#### **APOPTOSIS EN EL ENDOMETRIO EUTÓPICO Y EN LA ENDOMETRIOSIS**

El tejido endometrial sufre cambios morfológicos dinámicos a lo largo del ciclo menstrual. Regularmente durante la fase folicular, las células endometriales proliferan en forma activa y durante la fase secretoria, este crecimiento disminuye (29). De este modo, para asegurar el mantenimiento homeostático del tejido, deben existir mecanismos inhibitorios que contrarrestan la proliferación celular endometrial.

Se sabe que la apoptosis juega un papel importante en los cambios cíclicos que ocurren a lo largo del ciclo menstrual. Durante la menstruación, el endometrio uterino se descama y se produce una degeneración del tejido que involucra tanto procesos de necrosis como de apoptosis (30). Sin embargo, a pesar de los avances de la investigación básica en los últimos años, aún no se termina de dilucidar la manera precisa

por la cual los mecanismos de apoptosis, arresto del ciclo celular y proliferación celular se combinan e interaccionan en el endometrio humano.

Las células endometriales bajo condiciones apropiadas, sufren apoptosis. En 1976, Hopwood y col. (31) realizaron el primer estudio de apoptosis en el endometrio humano e identificaron cambios en la apoptosis de las células glandulares epiteliales a lo largo del ciclo menstrual. Más tarde, distintos autores describieron que la apoptosis del epitelio glandular endometrial varía a lo largo del ciclo reproductivo: aumenta durante la fase secretoria y alcanza un pico en la menstruación (30, 32, 33).

Se han estudiado también los cambios cíclicos de la expresión de la proteína reguladora de apoptosis Bcl-2. Se ha sugerido que la expresión de Bcl-2 en el endometrio humano estaría regulada in-vivo por la circulación de las hormonas esteroideas ováricas (33, 34).

Se determinó que la inmunoreactividad de las proteínas Bcl-2 y Bax es predominante en las células del epitelio glandular del endometrio y se confirmó que durante la fase proliferativa prevalece la proteína Bcl-2, mientras que la expresión de la proteína Bax se incrementa significativamente en la fase secretoria cuando prevalece la apoptosis (33).

De estos hallazgos se deduce la importancia de los oncogenes Bcl-2 y Bax en la regulación del crecimiento endometrial, aunque también se ha hallado involucrada la vía extrínseca en la regulación de la apoptosis que ocurre durante el ciclo menstrual (35, 36). En particular se ha hallado expresión aumentada de FasL y aumento de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 durante la fase secretoria y menstrual (37, 38).

Así como la apoptosis está involucrada en los cambios en el tejido endometrial que ocurren a nivel fisiológico, se ha asociado a la muerte celular programada con procesos

patológicos, especialmente en aquellos caracterizados por el incremento en el crecimiento celular como es el caso de la endometriosis.

La endometriosis se define como la presencia de focos de tejido endometrial funcionando fuera de la cavidad uterina. Es la enfermedad ginecológica más frecuente, afecta aproximadamente entre a un 3 y un 10% de las mujeres en edad reproductiva (39). Por otro lado, 20 a 50% de las pacientes que se someten a laparoscopias por dolor pélvico, presentan esta patología (40). Su origen es aún hoy discutido, sin embargo, la teoría más aceptada es la propuesta por Sampson que postula que se origina por migración de células del endometrio eutópico a la cavidad peritoneal a través de la menstruación retrógrada (41). Por otro lado, se ha propuesto que la alteración inmunológica e inflamatoria del ambiente peritoneal también contribuye al establecimiento de la endometriosis (42).

Actualmente se conoce que el tejido endometrial eutópico de las pacientes con endometriosis posee diferencias significativas con respecto al tejido uterino de las mujeres sin la enfermedad. Estas desigualdades observadas por diversos investigadores, otorgan sustento al concepto de que el endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis es inherentemente anómalo y juega un papel importante en la etiopatogenia de la enfermedad (43).

La proliferación celular y la muerte por apoptosis, son dos de las vías biológicas más importantes que normalmente regulan el crecimiento y la homeostasis tisular. En trabajos previos se ha observado una inhibición significativa de la apoptosis y un incremento de la proliferación celular del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis (44). Los bajos niveles de apoptosis observados por Meresman y col. (44) tanto en células epiteliales como en estromales han sido reportados también por

Dmowski y col. (45) en el tejido endometrial completo, quienes propusieron que la supervivencia de las células endometriales en un sitio ectópico dependería en parte, de la capacidad inherente de las células para morir o no por apoptosis.

Como ya se dijo, la muerte celular programada es controlada por la expresión de un número de genes regulatorios que incluyen, entre otros, al Bcl-2, que promueve la supervivencia celular bloqueando la apoptosis, y al Bax que antagoniza la actividad del Bcl-2. En estudios previos se ha observado que la capacidad de supervivencia aumentada que poseen las células endometriales de las pacientes con endometriosis, estaría regulada por el aumento de la proteína Bcl-2 y la disminución de Fas y FasL, lo que estaría sugiriendo un papel protagónico de estas moléculas en la regulación de la apoptosis endometrial (44, 46).

Asimismo en endometriosis, el fluido peritoneal posee una proporción significativamente mayor de macrófagos peritoneales que expresan Bcl-2 que el grupo control; mientras que en las mujeres sin endometriosis, el número de macrófagos peritoneales que expresan Bax está significativamente aumentado (47). Todas estas evidencias sugieren una predisposición de las células endometriales a ser resistentes a la apoptosis y a continuar sobreviviendo, lo que tendría importantes consecuencias en la proliferación del tejido endometrial ectópico.

La medicación utilizada para tratar la endometriosis incluye, entre otros protocolos, el uso de anticonceptivos orales o agonistas de GnRH, basándose en la sensibilidad del tejido endometriósico a responder a hormonas ováricas.

En estudios previos, se ha observado que los anticonceptivos orales combinados (AOC) modulan el crecimiento endometrial en las pacientes con endometriosis a través de la inducción de la muerte celular programada y de la inhibición de la proliferación

celular, dos de los factores que tendrían implicancias en el crecimiento y en la recurrencia de la enfermedad (46).

Asimismo, recientemente se ha evaluado la expresión de Fas y de FasL por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos en la fracción epitelial y en la fracción estromal del tejido endometrial de las pacientes tratadas con AOC y se ha realizado la cuantificación de la inmunomarcación por el método de Hscore (48).

Los resultados indican que el endometrio de las pacientes con endometriosis presenta una inhibición de la expresión de Fas comparado con el control. Los valores hallados en la fracción epitelial fueron de  $254 \pm 22$  en los controles y  $153 \pm 13$  en endometriosis (unidades de Hscore) ( $p < 0,05$ ) mientras que en la fracción estromal los resultados fueron de  $231 \pm 18$  y  $150 \pm 10$  en el endometrio eutópico de controles y de pacientes con endometriosis respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Esta inhibición observada en la expresión de Fas se relaciona con los bajos niveles de apoptosis previamente demostrados en las pacientes con endometriosis (46). Luego de la administración de AOC, además de la clara atrofia endometrial que se halló por el análisis histológico se observó un aumento de la expresión de Fas:  $298 \pm 34$  vs.  $153 \pm 13$  en células epiteliales y  $323 \pm 7$  vs.  $150 \pm 10$  en células estromales ( $p < 0,001$  vs. endometriosis antes del tratamiento con AOC) (Fig. 3A).

Este patrón de expresión de Fas fue comparable al observado en los controles ( $p > 0,05$ , no significativo), lo que indicaba que el incremento de la apoptosis observado luego de la administración de AOC era probablemente regulado por esta proteína. Asimismo se ha evaluado la expresión de FasL en esas mismas pacientes y hemos observado una disminución en la fracción epitelial del tejido endometrial de las mujeres con endometriosis comparado a los valores

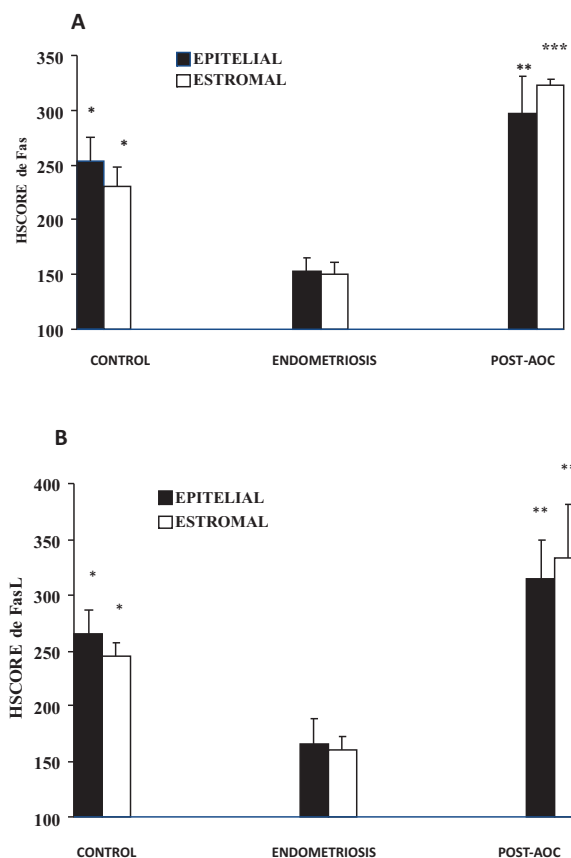


Fig. 3. Efecto de la administración de anticonceptivos orales combinados (AOC) a pacientes con endometriosis sobre la expresión de Fas y FasL en endometrio eutópico. Se evaluó la expresión de Fas (A) y de FasL (B) en la fracción epitelial (EPITELIAL) y en la fracción estromal (ESTROMAL) del tejido endometrial eutópico por inmunohistoquímica y se cuantificó por el método de Hscore, utilizando la fórmula  $HSCORE = \sum P_i(i+1)$  cuando  $i$  es el nivel de intensidad de la marca y  $P_i$  es el porcentaje de células que exhiben cada nivel de intensidad. La evaluación se realizó en mujeres controles libres de tratamiento hormonal (CONTROL,  $n=16$ ) y en pacientes con endometriosis (ENDOMETRIOSIS,  $n=18$ ) antes y después (Post-AOC) de la administración diaria de AOC, durante 30 días consecutivos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD en unidades de Hscore. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. endometriosis.

de las muestras controles:  $265 \pm 22$  vs.  $166 \pm 22$  respectivamente ( $p < 0,05$ ). Las células estromales presentaron un patrón similar de expresión de FasL:  $244 \pm 14$  (controles) y  $161 \pm 12$  (endometriosis) ( $p < 0,05$ ).

Luego de la administración de los AOC a pacientes con endometriosis se observó un marcado incremento de la expresión de FasL que se correspondía con el aumento de apoptosis observado previamente (46):  $315 \pm 34$  en células epiteliales y  $333 \pm 48$  en células estromales ( $p < 0,01$  vs. Endometriosis antes del tratamiento con AOC). En este caso también los niveles de expresión de FasL mostraron similitud con el control ( $P > 0,05$ , no significativo), lo que indicaría que este ligando también participaría en el aumento de apoptosis inducido por el tratamiento con AOC (Fig. 3B).

El papel de los estrógenos en la estimulación de la proliferación celular endometrial tanto in-vivo (49) como in-vitro (50) ha sido muy estudiado. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual los esteroides sexuales regulan el crecimiento endometrial, aún no está definido.

Un trabajo realizado por Rider y col. (51) ha propuesto que los estrógenos serían esenciales para la síntesis del receptor de progesterona y de factores de crecimiento necesarios para el progreso de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular. Asimismo, la administración de progestágenos ha demostrado estar involucrada en la inhibición de la proliferación endometrial (52) y se ha sugerido también una posible implicancia de estos compuestos sobre la inducción de la apoptosis (53).

Por otro lado, los agonistas y más recientemente los antagonistas de GnRH se emplean en el tratamiento de la endometriosis, sobre la base de una dependencia hormonal de los implantes ectópicos. El endometrio humano posee receptores de GnRH tanto en la fracción estromal como en la epitelial que se expresan durante todo

el ciclo menstrual (54). Los agonistas de GnRH, por un mecanismo de desensibilización hipofisaria, reducen en forma reversible la producción de gonadotrofinas y como consecuencia se suprimen los esteroides ováricos circulantes.

Los estudios del impacto del tratamiento con agonistas de GnRH sobre las lesiones endometriósicas, demostraron que los tamaños de las lesiones se reducen de forma significativa, independientemente de la gravedad de las mismas y en una proporción muy semejante sobre cada una de ellas (55, 56). Adicionalmente, se sabe que los agonistas de GnRH inducen la muerte celular por apoptosis en otros sistemas como en folículo ovárico, cuerpo lúteo, células de granulosa en cultivo (57) y en células provenientes de miomas uterinos (58).

Estudios previos realizados en un modelo experimental de endometriosis in-vitro han demostrado que tanto los agonistas como los antagonistas de GnRH modulan el crecimiento de las células endometriales provenientes de las pacientes con endometriosis a través de la inducción de la muerte celular programada mediada por las vías extrínseca e intrínseca, y a través de la inhibición de la proliferación celular, dos de los factores que tendrían implicaciones en el desarrollo y en la recurrencia de la enfermedad (59, 60).

Por otro lado, es sabido que la terapéutica que se propone actualmente a las pacientes con endometriosis no es del todo efectiva pues 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 (61). Dada esta situación, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes, y que acarreen menos efectos colaterales, es constante.

Entre las nuevas opciones para tratar la endometriosis, últimamente se ha propuesto a los inhibidores de aromatasa, a los

inhibidores de la enzima ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) y a los compuestos anti-angiogénicos. Antecedentes previos han demostrado la eficacia de estas nuevas alternativas terapéuticas tanto in-vivo como in-vitro (62, 63).

Los inhibidores de aromataza anastrozole y letrozole son utilizados con éxito en la terapéutica del cáncer de mama (64). Además del efecto supresor de la síntesis de estrógenos, se conocen efectos inductores de la apoptosis y anti-proliferativos directos de estos compuestos sobre algunos tipos celulares (65). En un estudio reciente hemos observado que tanto anastrozole como letrozole disminuyen la proliferación celular e incrementan la apoptosis en las células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis (66).

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) como la aspirina o el ibuprofeno inhiben la actividad de COX. El celecoxib pertenece a una nueva generación de AINEs que inhiben selectivamente COX-2 sin inhibir COX-1. 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 (67-69). 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 (68, 70). Se ha propuesto además que celecoxib actuaría en forma sinérgica con inhibidores de aromataza en el tratamiento del cáncer de mama, efecto que también se está evaluando a través de un estudio clínico actualmente en curso (64).

Estudios recientes sugieren que celecoxib favorecería la regresión de la lesión endometriósica, inhibiendo la proliferación celular, induciendo la apoptosis y disminu-

yendo la angiogénesis y avalan a esta droga para continuar siendo evaluada como alternativa terapéutica para la endometriosis (63, 71).

En síntesis, la muerte celular programada es un evento sumamente complejo y finamente regulado que está involucrado tanto en la fisiología como en la patología del sistema reproductor femenino. El hecho de que los tejidos reproductivos atraviesen por etapas cíclicas de crecimiento y muerte destaca la importancia del control de dicha proliferación celular para evitar un escape de los parámetros de normalidad. Este delicado balance entre la apoptosis y la proliferación celular es fundamental porque permite que los tejidos puedan responder en forma controlada a los cambios hormonales que acontecen en la vida reproductiva de las mujeres.

Por otro lado, se han detectado defectos en los niveles de apoptosis en ciertas patologías de tejidos reproductivos como en la endometriosis o en algunos tumores, donde la investigación básica está aportando nuevos fundamentos para utilizarlos en la búsqueda de alternativas terapéuticas más eficientes. En este sentido se han desarrollado medicamentos inductores de la apoptosis que fueron probados con éxito tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos (72). Siendo así, se abre una nueva esperanza en la terapéutica empleada en el manejo de los tumores y de la endometriosis que se basan en el conocimiento del desequilibrio entre los mecanismos de apoptosis y de proliferación celular.

## REFERENCIAS

1. Van Cruchten S, Van Den BW. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31:214-223.
2. Assuncao GC, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative death-

- styles. *Eur J Biochem* 2004; 271:1638-1650.
3. **Lawen A.** Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 2003; 25:888-896.
  4. **Allen RT, Hunter WJ, III, Agrawal DK.** Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997; 37:215-228.
  5. **Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME.** The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 2003; 15:185-193.
  6. **Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1):1-16.
  7. **Peter ME, Krammer PH.** The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10:26-35.
  8. **Youle RJ, Strasser A.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:47-59.
  9. **Burlacu A.** Regulation of apoptosis by Bel-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003; 7:249-257.
  10. **Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.
  11. **Steller H.** Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267:1445-1449.
  12. **Abud HE.** Shaping developing tissues by apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11:797-799.
  13. **Capel B.** The battle of the sexes. *Mech Dev* 2000; 92:89-103.
  14. **Kaipia A, Hsueh AJ.** Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:349-363.
  15. **Hussein MR.** Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005; 11:162-177.
  16. **McGee EA, Hsueh AJ.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200-214.
  17. **Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H.** Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123:23-30.
  18. **Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H.** Expression of Bel-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4379-4386.
  19. **Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenabeele P, D'Herde K.** Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 2008; 13:1065-1087.
  20. **Green KA, Streuli CH.** Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:1867-1883.
  21. **Humphreys RC, Krajewska M, Krnaeik S, Jaeger R, Weiher H, Krajewski S, Reed JC, Rosen JM.** Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development* 1996; 122:4013-4022.
  22. **Andres AC, Strange R.** Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4:221-228.
  23. **Jaeger R.** Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue culture experiments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63:231-240.
  24. **Feuerhake F, Sigg W, Hofter EA, Unterberger P, Welsch U.** Cell proliferation, apoptosis, and expression of Bel-2 and Bax in non-lactating human breast epithelium in relation to the menstrual cycle and reproductive history. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77:37-48.
  25. **Mills KR, Reginato M, Debnath J, Queenan B, Brugge JS.** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:3438-3443.
  26. **Mor G, Straszewski S, Kamsteeg M.** Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1305-1315.
  27. **Marti A, Graber H, Lazar H, Ritter PM, Baltzer A, Srinivasan A, Jaggi R.** Caspases: decoders of apoptotic signals during mammary involution. *Caspase activation during involution. Adv Exp Med Biol* 2000; 480:195-201.

28. **Metcalf AD, Gilmore A, Klinowska T, Oliver J, Valentijn AJ, Brown R, Ross A, MacGregor G, Hickman JA, Streuli CH.** Developmental regulation of Bel-2 family protein expression in the involuting mammary gland. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 11):1771-1783.
29. **Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A.** Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:50-63.
30. **Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N.** Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004; 10:29-38.
31. **Hopwood D, Levison DA.** Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 1976; 119:159-166.
32. **Harada T, Taniguchi F, Izawa M, Ohama Y, Takenaka Y, Tagashira Y, Ikeda A, Watanabe A, Iwabe T, Terakawa N.** Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci* 2007; 12:3140-3151.
33. **Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL, Isaacs KB.** Differential expression of members of the bel-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2738-2746.
34. **Jones RK, Searle RF, Bulmer JN.** Apoptosis and bel-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998; 13:3496-3502.
35. **Wei P, Jin X, Tao SX, Han CS, Liu YX.** Fas, FasL, Bel-2, and Bax in the endometrium of rhesus monkey during the menstrual cycle. *Mol Reprod Dev* 2005; 70:478-484.
36. **Yamashita H, Otsuki Y, Matsumoto K, Ueki K, Ueki M.** Fas ligand, Fas antigen and Bel-2 expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:358-364.
37. **Otsuki Y.** Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 2001; 34:166-173.
38. **Selam B, Kayisli UA, Mulayim N, Arici A.** Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod* 2001; 65:979-985.
39. **McLeod BS, Retzlaff MG.** Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53:389-396.
40. **Wu MH, Shoji Y, Chuang PC, Tsai SJ.** Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Rev Mol Med* 2007; 9:1-20.
41. **Sampson JA.** Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-469.
42. **Jensen JR, Coddington CC.** III. Evolving spectrum: the pathogenesis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53:379-388.
43. **Ulukus M, Cakmak H, Arici A.** The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13:467-476.
44. **Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS.** Apoptosis and expression of Bel-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74:760-766.
45. **Dmowski WP, Gebel H, Braun DP.** Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4:696-701.
46. **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: 1141-1147.
47. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK.** Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bel-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid

- macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12:146-152.
48. **Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, Cortez A, Siffroi JP, Darai E.** Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol* 2006; 70:151-162.
  49. **Deligdisch L.** Hormonal pathology of the endometrium. *Mod Pathol* 2000; 13:285-294.
  50. **Pierro E, Minici F, Alesiani O, Miceli F, Proto C, Screpanti I, Mancuso S, Lanzone A.** Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium. *Biol Reprod* 2001; 64:831-838.
  51. **Rider V, Kimler BF, Justice WM.** Progesterone-growth factor interactions in uterine stromal cells. *Biol Reprod* 1998; 59:464-469.
  52. **Moyer DL, Felix JC.** The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. *Contraception* 1998; 57:399-403.
  53. **Critchley HO, Tong S, Cameron ST, Drudy TA, Kelly RW, Baird DT.** Regulation of *bc1-2* gene family members in human endometrium by antiprogestin administration in vivo. *J Reprod Fertil* 1999; 115:389-395.
  54. **Grundker C, Schlotawa L, Viereck V, Eicke N, Horst A, Kairies B, Emons G.** Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol* 2004; 151:141-149.
  55. **Borroni R, Di Blasio AM, Gaffuri B, Santorsola R, Busacca M, Vignano P, Vignali M.** Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159:37-43.
  56. **Vignali M.** Molecular action of GnRH analogues on ectopic endometrial cells. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 45 Suppl 1:2-5.
  57. **Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H, Tesone M.** Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:287-294.
  58. **Wang Y, Matsuo H, Kurachi O, Maruo T.** Down-regulation of proliferation and up-regulation of apoptosis by gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured uterine leiomyoma cells. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:447-456.
  59. **Tesone M, Bilotas M, Baranao RI, Meresman G.** The role of GnRH analogues in endometriosis-associated apoptosis and angiogenesis. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 66 Suppl 1:10-18.
  60. **Bilotas M, Baranao RI, Buquet R, Sueldo C, Tesone M, Meresman G.** Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of *Bcl-2*, *Bax*, *Fas* and *FasL* proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod* 2007; 22:644-653.
  61. **Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, Ragni N.** Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Surv* 2005; 60:817-826.
  62. **Bilotas M, Meresman G, Stella I, Sueldo C, Baranao RI.** Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 93:2513-2518.
  63. **Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, Tesone M, Meresman G.** Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008; 23:2701-2708.
  64. **Goss PE.** Breast cancer prevention-clinical trials strategies involving aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86:487-493.
  65. **Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM.** Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003; 63:8037-8050.
  66. **Meresman GF, Bilotas M, Abello V, Buquet R, Tesone M, Sueldo C.** Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cul-



- tures from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84:459-463.
67. **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.
68. **Jendrossek V, Handrick R, Belka C.** Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 2003; 17:1547-1549.
69. **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; 82:1609-1615.
70. **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; 2:265-271.
71. **Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Baranao RI, Meresman G.** The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 96: 428-433.
72. **Kim R.** Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anti-cancer therapy. *Cancer* 2005; 103:1551-1560.