Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de nuevas terapias naturales y antiangiogénicas para el tratamiento de la endometriosis

Ricci, Analía Gabriela

2012-03-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ricci, Analía Gabriela. (2012-03-26). Estudio de nuevas terapias naturales y antiangiogénicas para el tratamiento de la endometriosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Ricci, Analía Gabriela. "Estudio de nuevas terapias naturales y antiangiogénicas para el tratamiento de la endometriosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-03-26.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de nuevas terapias naturales y antiangiogénicas para el tratamiento de la endometriosis

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Analía Gabriela Ricci

Director de tesis: Dra. Rosa Inés Barañao

Consejero de estudios: Dra. Nora Ceballos

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires, 2012

ESTUDIO DE NUEVAS TERAPIAS NATURALES Y ANTIANGIOGÉNICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS

La endometriosis se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina y sus principales síntomas asociados son el dolor y la infertilidad. Las terapias médicas disponibles actualmente resultan insuficientes debido a las altas recidivas de la enfermedad y los efectos adversos que generan. Asimismo, en los últimos años, se ha propuesto a los inhibidores de la angiogénesis como posible alternativa terapéutica, así como también el uso de compuestos naturales presentes en alimentos que formen parte de nuestra dieta.

El objetivo general de esta tesis consistió en evaluar el efecto de un agente antiangiogénico, el bevacizumab, y de dos polifenoles naturales, el resveratrol y el galato de epigalocatequina (EGCG); sobre el crecimiento de lesiones endometriósicas en un modelo murino de endometriosis. Asimismo, se estudió el efecto *in vitro* de los polifenoles sobre la supervivencia de células epiteliales de endometrio eutópico provenientes de pacientes con endometriosis y mujeres controles.

Nuestros resultados sugieren que el resveratrol y el EGCG tendrían un efecto inhibidor del crecimiento del endometrio ectópico, regulando los niveles de apoptosis y proliferación celular, así como la vascularización de la lesión endometriósica. El bevacizumab también mostró ser efectivo en la inhibición de la endometriosis en el modelo murino. No obstante, es importante considerar sus posibles efectos secundarios y su costo como tratamiento. Siendo así, sugerimos que el resveratrol y el EGCG serían una opción terapéutica promisoria.

Los resultados obtenidos en esta tesis avalan continuar investigando estos compuestos naturales para poder definir los mecanismos de acción que participan en el efecto inhibitorio observado, y determinar también las concentraciones plasmáticas efectivas en pacientes para poder esclarecer su potencial utilidad como agentes preventivos en el tratamiento de la endometriosis.

Palabras clave: endometriosis, VEGF, bevacizumab, resveratrol, EGCG, apoptosis, proliferación celular, angiogénesis.

NEW NATURAL AND ANTIANGIOGENIC THERAPIES FOR ENDOMETRIOSIS TREATMENT

Endometriosis is defined as the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity being its main associated symptoms, pain and infertility. Medical therapies available up to date are unsatisfactory due to their adverse effects and the frequent pathology recurrences. In the last few years, antiangiogenic agents and several natural compounds present in different dietary sources have been proposed as a potent alternative therapy.

Given this scenario, the general objective of the present thesis was to evaluate the effect of bevacizumab, known for its antiangiogenic properties, as well as the effect of two natural polyphenols, resveratrol and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), on the growth of endometriotic lesions in a mouse model of endometriosis surgically induced. Moreover, the effect of both polyphenols on the survival of epithelial endometrial cells from endometriosis patients and control subjects was evaluated in vitro.

Our results suggest that resveratrol and EGCG would have a repressive effect on endometriotic growth, by increasing apoptosis and reducing cell proliferation and vascularization within the epithelial fraction of the endometriotic lesion. Bevacizumab was also effective in the inhibition of endometriosis development in the mouse model. Nevertheless, it is important to take into account its adverse effects as well as its cost. Based on these data, we propose that resveratrol and EGCG become a promising therapeutic option.

Our results support to keep ongoing with the research in order to elucidate the mechanisms of action involved in the observed inhibitory effects, and determine the effective doses for patients to clarify the usefulness of these agents in endometriosis treatment.

Keywords: endometriosis, VEGF, bevacizumab, resveratrol, EGCG, apoptosis, cell proliferation, angiogenesis.

AGRADECIMIENTOS

En este espacio quiero agradecerles a todos los que formaron parte de esta etapa y contribuyeron para que este trabajo pudiera realizarse:

Ine, gracias por darme la oportunidad de formar parte de tu laboratorio y permitirme crecer profesionalmente, apoyando mis decisiones y confiando en mi criterio científico. Por tu calidad humana invalorable, que fomenta el buen clima dentro del laboratorio y nos permite sentirnos bien acompañados.

Gaby, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, aconsejarme y guiarme en este camino. Por ser parte fundamental de este trabajo, alentarme en la investigación y por todos los buenos momentos que compartimos juntas.

Mariel, gracias por ser mi gurú. Porque tenés una respuesta para cada pregunta y sin tu enseñanza no habría llegado nunca a este punto. Además de tu buena predisposición para ayudarme durante toda mi carrera, siempre fuiste una excelente amiga que supo darme aliento cuando me ganaba el cansancio.

Carli, gracias por ser mi hermana científica. Porque recorrimos este camino juntas, con sus buenos y malos momentos, sabiendo acompañarnos y compartiendo cada paso. Porque estás siempre ahí, con las palabras justas y necesarias en cada momento. Con vos aprendí lo invalorable que es el trabajo en equipo y lo afortunada que fui empezando el doctorado con una compañera que se transformó en una parte importantísima de mi vida.

Val, tu energía es lo que más extraño los miércoles. Sos uno de esos grandes tesoros que uno logra a lo largo de la vida y estoy feliz de haberte encontrado en mi lugar de trabajo. Tu amistad me cambió los últimos años de doctorado y ahora me cuesta imaginar el trabajo sin tus mimos cotidianos.

Marin, gracias por acompañarme siempre, con charlas y consejos. Porque entre mate y viaje a CAECE, fuimos compartiendo secretos y buenos momentos. Te quiero blondy!

Vani, gracias por estar siempre dispuesta a escuchar. Sos una excelente compañera y amiga … y todavía nos queda mucho por compartir.

Querido pasillo y aledaños: Lucre, JC, Vir, Pau, Meli, Barbi, Flor, Lari, Flor V., Marina, Lucas, Colo, Juani, Lili, Ari, Isa, Ale y Leo, gracias porque todos logran transformar mi día de trabajo en algo placentero y porque trabajando entre ustedes me siento “como en casa”.

A los Rabi y el 218: gracias por los consejos, la buena predisposición para ayudar y compartir, y por las charlas de pasillo.

A la gente linda del Ibyme: Chucky, Martín y Cele, gracias por los momentos compartidos y la buena onda que me alegran el día de trabajo.

Pao y Naty, las técnicas del bioterio, gracias por ayudarme con los experimentos, y estar siempre dispuestas a enseñarme a trabajar con buen criterio.

Rumy y Let, mis amigas del alma. Sin ustedes no sé como hubiese llegado hasta acá. Imposible resumir lo importantes que son en mi vida. En cada decisión tomada están ustedes, cambiándome la perspectiva y dándome la energía que me caracteriza. Las quiero infinito punto rojo.

A mi Comana, porque sos TODO para mí.

A mis viejos, porque sin el apoyo que me dieron desde el principio no sería la profesional que soy hoy. De ustedes es el mérito de que haya sabido priorizar mi vocación, sin bajar los brazos y pudiendo disfrutar del placer de llegar a cada meta. Tengo que agradecerles porque siempre confiaron en mí y me supieron transmitir que podía lograr todo lo que me propusiera. De ustedes saqué la fuerza que me faltaba cada vez que el camino se hacía cuesta arriba. Gracias!

A mi abuela, porque tus mimos y tu compañía acompañan el mejor recuerdo que me llevo de mis primeros años de estudiante.

Y finalmente a Tatu, mi verdadero cable a tierra, porque completas mi vida y amo tu manera de acompañarme en cada paso. Gracias por tu apoyo incondicional y por ayudarme a crecer.

A mi familia y amigos

...por ser mi fuente de energía

“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos.”

(*El principito*, capítulo II)

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AINEs: Anti-inflamatorios no esteroideos

BSA: Albúmina de suero bovino

CEE: Células epiteliales endometriales

COX-2: Ciclooxigenasa-2

DAB: Diaminobencidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

E_2: Estradiol

EBM: Medio basal endotelial

EC: Epicatequina

ECG: Galato de epicatequina

EDT: Endometriosis

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGC: Epigalocatequina

EGCG: Galato de epigalocatequina

EGM: Medio de crecimiento de células endoteliales

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FDA: Administración de drogas y alimentos

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HEECs: Células endoteliales endometriales humanas

HPV: Virus del papiloma humano

HUVECs: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

IFN-α: Interferón α

IgG: Inmunoglobulina G

IL-12: Interleuquina 12

IL-1β: Interleuquina 1β

IL-2: Interleuquina 2

IL-6: Interleuquina 6

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LH: Hormona luteinizante

MC: Medio condicionado

MCP-1: Proteína quemotáctica de monocitos 1

MIP-1/2: Proteína inflamatoria del macrófago 1 y 2

MTS: 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-5-(3-carboxi metoxi fenil) -2-(4-sulfo fenil)-2H-tetrazolio

PBS: Buffer fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PFS: Supervivencia libre de progresión

PPAR-γ: Receptor activado de proliferadores peroxisómicos γ

SFB: Suero fetal bovino

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TUNEL: Marcación terminal con dUTP-digoxigenina mediada por TdT

VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 13
Endometriosis 14
Clasificación 14
Etiología 16
Sintomatología 18
Diagnóstico y tratamiento 19
Nuevos blancos terapéuticos 23
Angiogénesis y endometriosis 25
Terapias antiangiogénicas 27
Terapias naturales 28
Galato de epigalocatequina (EGCG) 30
Resveratrol 32
OBJETIVOS 34
Objetivos generales 34
Objetivos específicos 35
MATERIALES Y MÉTODOS 37
Experimentos *in vivo* 37
Animales 37
Cirugía 37
Diseño experimental 37
Evaluación del ciclo estral 39
Evaluación del tejido ectópico 39
Inmunohistoquímica - Evaluación de la proliferación celular y la vascularización 39
Evaluación de la apoptosis 41

Evaluación de los niveles de VEGF 41
Experimentos *in vitro* 42
Cultivos de macrófagos peritoneales del modelo de endometriosis murino 42
Pacientes 43
Aislamiento y cultivo de células epiteliales de endometrio humano 43
Evaluación de la proliferación celular en cultivos de células epiteliales endometriales humanas 44
Evaluación de la apoptosis celular en cultivos de células epiteliales endometriales humanas 44
Ensayos de migración de células endoteliales endometriales humanas 45
Análisis estadístico 48
RESULTADOS 49
Niveles de VEGF en cultivos de macrófagos peritoneales 50
Tratamientos antiangiogénicos 52
Efecto del anticuerpo anti-VEGF murino sobre el desarrollo de la endometriosis *in vivo* 52
Efecto del bevacizumab sobre el desarrollo de la endometriosis *in vivo* 54
Tratamientos naturales 59
Efecto del resveratrol y del EGCG sobre el ciclo estral 59
Efecto del EGCG sobre el desarrollo de la endometriosis *in vivo* 60
Efecto del resveratrol sobre el desarrollo de la endometriosis *in vivo* 65
Efecto del resveratrol y del EGCG sobre el crecimiento de células epiteliales endometriales humanas 70
Migración de células endoteliales endometriales humanas 75
Efecto del resveratrol sobre la migración de HEEC 76
Efecto del tejido endometrial sobre la migración de HEEC 78
Efecto del líquido peritoneal de pacientes sobre la migración de HEEC 80
DISCUSIÓN 82
Terapias antiangiogénicas 83
Tratamientos naturales 87

El tejido endometrial ectópico y el líquido peritoneal participan de la inducción de la angiogénesis en endometriosis 93

CONCLUSIÓN FINAL 94

BIBLIOGRAFÍA 96

INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una de las enfermedades ginecológicas más frecuentes y se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. A pesar de tratarse de una enfermedad benigna, suele estar asociada a diversas manifestaciones clínicas que resultan en una calidad de vida limitada para las pacientes. La mayoría recurren a la consulta médica por dos síntomas puntuales: el dolor y la infertilidad. Desde que fue descripta por primera vez en el siglo XIX, la endometriosis se ha caracterizado por ser una enfermedad enigmática. A pesar de que varias teorías han sido postuladas para explicar su etiología aún hoy no existe un consenso acerca del origen de esta enfermedad. La variedad de lesiones y de localizaciones en que se manifiesta en el organismo condujo a la idea de que podría ser originada por distintos mecanismos.

La falta de conocimiento sobre la etiología de esta enfermedad contribuye en parte a la falta de un tratamiento totalmente efectivo. Los tratamientos disponibles actualmente apuntan a remover las lesiones endometriósicas, ya sea quirúrgicamente o generando un estado de hipoestrogenismo. Sin embargo, estas terapias no corrigen los mecanismos moleculares aberrantes subyacentes que llevaron al desarrollo de la patología, lo cual explica la baja eficacia de los tratamientos y el alto porcentaje de recidivas. Además deben tenerse en cuenta los efectos secundarios indeseados asociados comúnmente a la mayoría de los tratamientos médicos, que imposibilitan su uso por períodos prolongados.

A partir de los avances disponibles en el conocimiento de la endometriosis, en esta tesis doctoral nos focalizamos en el estudio de nuevas alternativas terapéuticas que puedan ofrecer una mayor eficacia con menores efectos adversos, analizando su efecto sobre posibles mecanismos implicados en su desarrollo.

ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es una de las enfermedades ginecológicas benignas más frecuentes en mujeres de edad reproductiva y se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina (1,2). El tejido endometrial puede implantarse en distintos sitios de la cavidad abdominal y desarrollar lesiones endometriósicas. El área más comúnmente afectada es la pelvis, principalmente los ovarios y demás áreas cubiertas por el peritoneo, como las paredes del útero, el ligamento úterosacro y el saco de Douglas. Más raramente pueden encontrarse lesiones endometriósicas fuera de la pelvis, incluyendo cérvix, vagina, vulva, tracto intestinal, tracto urinario y pared abdominal (3).

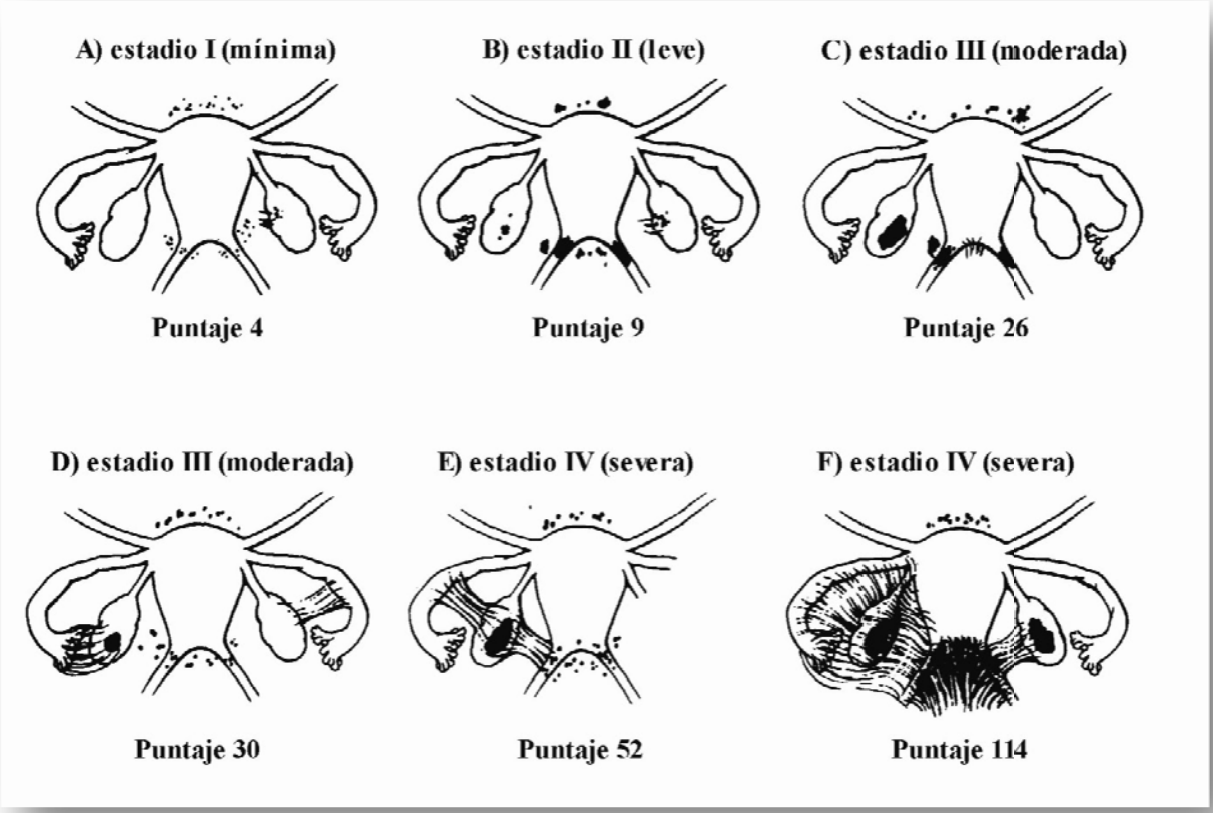
Si bien la enfermedad se presenta mayoritariamente en mujeres en edad reproductiva, se han documentado casos de endometriosis en mujeres post-menopáusicas y adolescentes, sobre todo en aquellas adolescentes con ciertas anomalías uterinas (4). Su prevalencia alcanza el 14% de la población, pero en mujeres con dolor pélvico y/o infertilidad, la frecuencia aumenta al 35%-50% (5). Sin embargo, la prevalencia está generalmente subestimada, debido a la dificultad que se presenta en el diagnóstico y por sus manifestaciones clínicas heterogéneas.

CLASIFICACIÓN

La clasificación actual para la endometriosis fue realizada por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva y revisada por última vez en 1996 (6). Se basa en la aplicación de un sistema de puntuación que asigna valores arbitrarios a las lesiones endometriósicas según el tamaño, profundidad, localización y grado de adhesión de las mismas. Para cada paciente se obtiene un puntaje final que es el que define el estadio de la enfermedad (Tabla 1, Esquema 1).

El objetivo de esta clasificación es proveer una manera clara de documentar la extensión y localización de la enfermedad. Además tiene en cuenta la apariencia morfológica de las lesiones categorizadas como rojas (rojas, rojo-rosadas y claras), blancas (blancas, amarillo-marrones y defectos peritoneales) y negras (negras y azules); ya que existen evidencias que sugieren que la morfología de las lesiones endometriósicas estaría relacionada con su actividad biológica y ésta podría tener un impacto en la fertilidad (7-9).

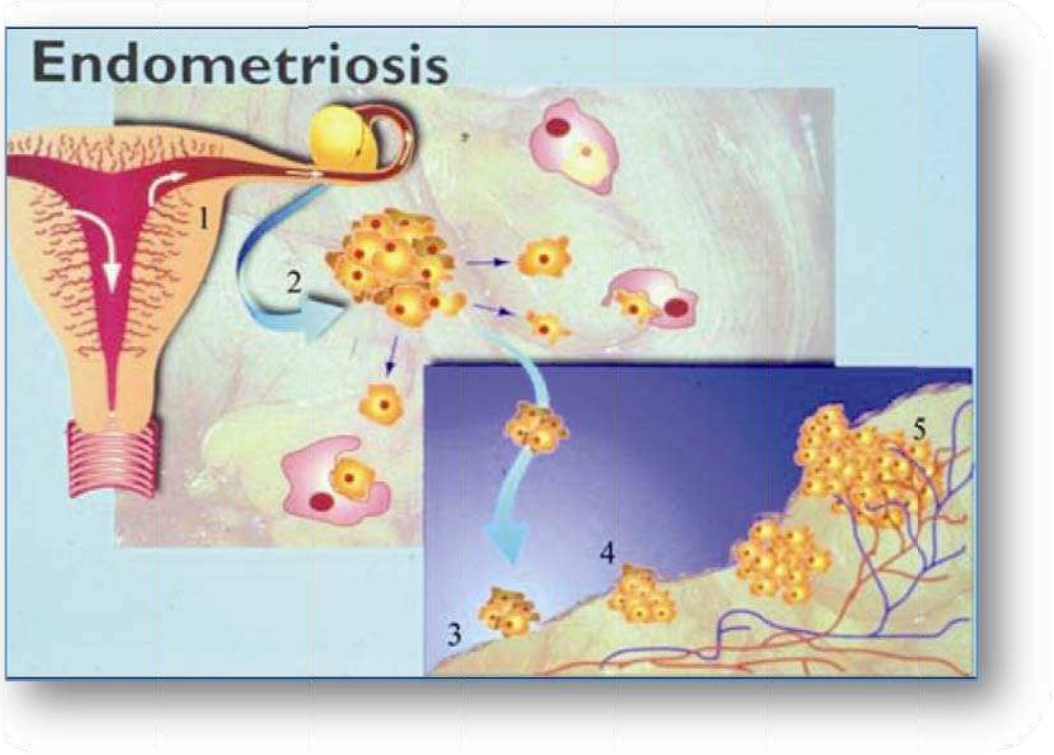
Tabla 1. Estadios de la endometriosis. Modificada de (10).			
Estadio	**Grado**	**Puntuación**	**Descripción**
I	Minima	1-5	Unos pocos implantes superficiales
II	Leve	6-15	Más implantes y un poco más profundos
III	Moderada	16-40	Muchos implantes profundos, pequeños endometriomas en uno o ambos ovarios; algunas adhesiones difusas
IV	Severa	>40	Muchos implantes profundos, grandes endometriomas en uno o ambos ovarios; muchas adhesiones densas, algunas veces con adherencia del recto al útero.



Esquema 1. Estadios de la endometriosis. Se muestran ejemplos de la aplicación de la clasificación de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva. En negro se grafican las zonas con endometriosis. Nótese en D, E y F las zonas de adhesión entre el ovario y las trompas y en F, la obliteración total del saco de Douglas. Modificada de (6).

ETIOLOGÍA

Hasta el momento no se conoce con certeza su etiología. La teoría más aceptada es la *Teoría de la Implantación* propuesta por Sampson en 1927 (11,12), la cual propone que la endometriosis se origina por menstruación retrógrada a través de las Trompas de Falopio y su posterior depósito en la cavidad peritoneal (Esquema 2). Según esta teoría en el fluido menstrual existirían fragmentos endometriales viables con capacidad de alcanzar el ambiente peritoneal, adherirse al peritoneo, invadirlo, vascularizarse y proliferar dando lugar a lo que se conoce como "lesiones endometriósicas". De esta manera, la endometriosis se resumiría como un autotransplante de tejido endometrial en un sitio ectópico.



Esquema 2. Teoría de la implantación. El fluido menstrual puede pasar en forma retrógrada a la cavidad abdominal (1). Una vez allí, algunas células son fagocitadas por los macrófagos del sistema inmune, mientras que otros fragmentos endometriales sobreviven (2). Estos fragmentos se adhieren a la superficie peritoneal (3), invaden la matriz extracelular (4), proliferan y se vascularizan (5) originando las lesiones endometriósicas. Tomada de (13).

Actualmente existen numerosas evidencias que avalan esta teoría, como por ejemplo: la mayor parte de las mujeres presentan cierto grado menstruación retrógrada (14); se han

encontrado células endometriales viables en el líquido peritoneal (15); se ha logrado experimentalmente que el endometrio se implante y crezca en la cavidad peritoneal (16); las células endometriales expresan moléculas de adhesión en su superficie (9,17,18); fragmentos de endometrio hallados en la cavidad abdominal expresan metaloproteinasas capaces de degradar la membrana basal y la matriz extracelular (19); el endometrio produce factores angiogénicos necesarios para su neovascularización local (13,20); la incidencia de endometriosis aumenta en mujeres con obstrucciones anatómicas en las vías de salida del flujo menstrual (21,22); el riesgo de padecer endometriosis aumenta por factores tales como la menarca a edad temprana, ciclos menstruales cortos y mayor duración e intensidad del flujo menstrual (23).

Sin embargo, a pesar de ser la teoría con mayor aceptación, falla en explicar la presencia de endometriosis en sitios remotos fuera de la cavidad peritoneal, como ser la piel, los pulmones, la nariz y los nódulos linfáticos (2).

La *Teoría de la Metaplasia Celómica*, propuesta por Meyer en 1919 (24) y apoyada por Novak en 1931 (25), sugiere que las lesiones endometriósicas se originarían por metaplasia de las células que tapizan el peritoneo a partir de la inducción de un factor hormonal u otro estímulo. Esta teoría explicaría la presencia de endometriosis en hombres (26), en niñas prepúberes (27), en mujeres que nunca han menstruado (28,29) y en sitios poco frecuentes como la pleura (30), además de en los sitios comunes. Sin embargo, no existen suficientes evidencias clínicas y experimentales que la avalen.

También se propuso la *Teoría del Origen Embriológico*, postulada por Von Recklinghausen, quien planteó que los implantes endometriósicos podrían originarse a partir de restos del conducto de Wolff, los cuales desarrollarían endometrio funcional por metaplasia bajo un estímulo específico (31). Más tarde Russell propuso que las lesiones podrían formarse a partir de restos del conducto de Müller (32). Sin embargo esta patología fue descripta como Mülleranosis, a pesar de no haber sido demostrada su diferencia con la endometriosis (33). Esta teoría no fue muy aceptada entre los investigadores por carecer de argumentos sólidos que la avalen (34), aunque hoy en día está siendo considerada y analizada nuevamente (35).

Nisolle y Donnez han propuesto que los endometriomas ováricos y las lesiones rectovaginales poseen distinto origen histológico, lo cual resulta inexplicable a partir de una única teoría (36). Para estos autores los endometriomas ováricos se originarían por invaginación del mesotelio que cubre el ovario y posterior metaplasia del epitelio celómico, mientras que la endometriosis del septo rectovaginal se originaría por metaplasia de restos del conducto de

Müller. Sin embargo, esta disociación del origen histológico de los distintos tipos de lesiones ha sido discutida por algunos autores (37).

Recientemente, la *Teoría de las Células Madre Endometriales ó Células Progenitoras Transitorias* propone que las células madre en circulación originadas en la médula ósea ó en la capa basal del endometrio podrían diferenciarse en tejido endometriósico en sitios anatómicamente diferentes (2,38,39).

En la actualidad, debido a las numerosas evidencias que la avalan y debido a la carencia de una explicación mejor, la teoría de la implantación propuesta por Sampson continúa siendo la más aceptada para explicar el origen de las lesiones endometriósicas.

Teniendo en cuenta esta teoría y el hecho de que la mayoría de las mujeres presentan cierto grado de menstruación retrógrada pero sólo un porcentaje de ellas desarrolla la enfermedad, se ha sugerido que deben existir factores etiológicos propios de las pacientes con endometriosis que favorezcan la formación de las lesiones endometriósicas. En los últimos años se han descripto varias alteraciones tanto en el ambiente peritoneal como en el endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis, las cuales no se presentan en las mujeres sanas. Este hecho plantea la hipótesis de que las lesiones endometriósicas poseen defectos primarios que tienen su origen en el endometrio eutópico y que le confieren un mayor potencial para implantarse y crecer en la superficie peritoneal. Entre las alteraciones descriptas se encuentran anomalías en la estructura, en la proliferación, en la apoptosis, en los componentes inmunes, en las moléculas de adhesión, en la sensibilidad a esteroides y citoquinas y en la producción de los mismos, en la expresión de enzimas proteolíticas y sus inhibidores y en la expresión génica (40). Sin embargo, resulta difícil poder determinar si estas alteraciones son la causa o la consecuencia de la presencia de la enfermedad.

Actualmente se considera que la endometriosis es una enfermedad multifactorial con características diversas y por consiguiente todas las teorías sobre su patogenia se deben incorporar complementariamente sin considerarlas excluyentes entre sí (35).

SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas más evidentes asociados a la endometriosis son dolor pélvico agudo, dispareunia, dismenorrea y metrorragia, causando frecuentemente infertilidad. También pueden presentarse síntomas cíclicos o premenstruales (por ejemplo asociados a la vejiga o al intestino

grueso) con o sin sangrado anormal y fatiga crónica. Asimismo existen ciertos signos clínicos que pueden estar asociados a esta enfermedad como la sensibilidad pélvica, la presencia de un útero fijo en retroversión, los ligamentos úterosacros sensibles, y los ovarios agrandados (41).

Se han sugerido diversas causas que explicarían los mecanismos del dolor asociado a la endometriosis. Las lesiones profundas podrían estimular terminales nerviosas del dolor; o bien la inflamación local con la consecuente producción de prostaglandinas podría contribuir a acrecentar el síntoma (10). Sin embargo existe una débil correlación entre la severidad de la enfermedad y el carácter del dolor (42). Mujeres que padecen una endometriosis grave pueden ser asintomáticas, mientras que otras, con un desarrollo de la enfermedad mínimo, pueden padecer un dolor invalidante. Más aún, se ha encontrado endometriosis asintomática en el 50% de las pacientes que se someten a laparoscopía por otras causas (43). No obstante, se ha visto que si la dismenorrea es severa y no responde a agentes anti-inflamatorios no esteroideos y/o a anticonceptivos orales, es probable que esté asociada a endometriosis. Asimismo, cuando el septo rectovaginal o el ligamento úterosacro están afectados por la enfermedad, el dolor usualmente se observa en la zona del recto o en la parte baja de la espalda, pudiendo irradiarse hacia las piernas.

La dispareunia está asociada frecuentemente a la localización de lesiones en el septo rectovaginal y en el ligamento úterosacro o a la fijación de adhesiones en el útero o los ovarios (3).

Se estima que el 50% de las mujeres que tienen endometriosis son infértiles y que un porcentaje similar de mujeres infértiles padece endometriosis (10). Muchas veces la infertilidad es el único síntoma asociado a la endometriosis, aunque usualmente se presenta con dolor pélvico. Las causas certeras de la infertilidad asociada a la endometriosis se desconocen. Algunas pueden ser la presencia de adhesiones significativas y distorsiones anatómicas; alteraciones en la composición del líquido peritoneal, que resulta tóxico para la función espermática y tiene efectos adversos en el embrión; y/o alteraciones en el endometrio eutópico que afectan a la implantación (44).

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Los objetivos principales a los que apunta el tratamiento de la endometriosis son remover las lesiones endometriósicas, restaurar la anatomía normal, prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad y aliviar los síntomas. La elección del tratamiento dependerá de los síntomas que presenta la paciente (dolor y/o infertilidad) y de sus deseos reproductivos (10). Puede consistir

entonces en la remoción de las lesiones endometriósicas por cirugía (tratamiento quirúrgico) o en la inducción de la atrofia de los implantes mediante la utilización de medicamentos (tratamiento médico). También puede utilizarse un tratamiento combinado.

El diagnóstico definitivo de la endometriosis se logra únicamente mediante la visualización directa de las lesiones endometriósicas en la cavidad peritoneal, ya sea por laparoscopía o por laparotomía, acompañada por una confirmación histológica (45). Este método permite la remoción de las lesiones al momento del diagnóstico (41). Sin embargo existen algunas desventajas que hacen que este método sea cuestionado: 1) El diagnóstico puede ser subjetivo ya que está sujeto a la experiencia del cirujano; 2) Las lesiones endometriósicas no siempre son evidentes a simple vista; 3) Se trata de un método invasivo que puede acarrear complicaciones y resulta costoso.

La cirugía que se realiza puede ser conservadora o radical. La cirugía conservadora consiste en la remoción de las lesiones endometriósicas y la separación de las adhesiones para restaurar la anatomía normal de la cavidad pélvica. La cirugía radical implica, además, la remoción del útero y/o de los ovarios (45,46). En la actualidad, y sobre todo en mujeres jóvenes, se elige como primera opción realizar laparoscopias conservadoras de las funciones reproductivas.

Debido a su naturaleza invasiva, la laparoscopía no puede ser prescripta como primer paso de rutina en el seguimiento de pacientes con infertilidad y/o dolor pélvico.

Los intentos de desarrollar instrumentos no invasivos confiables para detectar la endometriosis han permanecido inconclusos, por lo tanto la laparoscopía es aún el método diagnóstico por excelencia. No obstante, algunas formas de la enfermedad ahora pueden ser diagnosticadas por imágenes de alta resolución de manera precisa previamente a la cirugía. Por ejemplo, se ha reportado que el diagnóstico de endometriomas ováricos por ultrasonido transvaginal tiene entre un 84-100% de sensibilidad y entre un 90-100% de especificidad (47).

Es importante destacar que a pesar de ser un pilar en el diagnóstico y tratamiento de la endometriosis, la laparoscopía provee un alivio temporario, ya que esta patología se caracteriza por una tasa de recurrencia del 21,5% a los dos años y entre un 40-45% a los 5 años (48). El uso de cirugías sistemáticas para tratar las recidivas de la enfermedad presenta un alto riesgo de conducir complicaciones y de reducir los beneficios consecuentes. Por este motivo la búsqueda de un método menos invasivo y más accesible continúa, principalmente focalizada en la prevención o en el tratamiento de recurrencias (48).

Dado que la endometriosis ha sido identificada como una enfermedad estrógeno-

dependiente (49), los tratamientos médicos se basan en regular inhibitoriamente la producción de estrógenos. Se ha demostrado que las lesiones endometriósicas poseen las enzimas necesarias para la síntesis *de novo* de estas hormonas partiendo del colesterol, sin necesitar precursores androgénicos (50). En el endometrio eutópico y ectópico de las pacientes con endometriosis se han encontrado alteraciones en la expresión de varias de estas enzimas, lo que conduce a un mecanismo de retroalimentación positiva tendiente a la producción local y continua de estrógenos (51-53).

En la actualidad, el estado de hipoestrogenismo se alcanza mediante la aplicación de agonistas de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), progestágenos, anticonceptivos orales combinados o agentes androgénicos (46). Estos tratamientos hormonales imitan estados que reducen el riesgo de desarrollar endometriosis por la dependencia hormonal de las lesiones, como la menospausia, el embarazo o la amenorrea. Sin embargo los efectos colaterales de estos tratamientos impiden su uso prolongado y no resultan enteramente eficaces (4,54). El principal problema radica en que estas drogas disminuyen los niveles de estrógenos sistemáticamente y su influencia no se limita a las lesiones sino también a otros mecanismos controlados hormonalmente, resultando altamente inespecíficos. Por otra parte impiden la ovulación lo cual representa un problema para las pacientes que desean quedar embarazadas.

Desde 1978 se promueve el uso de regímenes no hormonales para tratar el dolor asociado a la endometriosis, incluyendo una gran variedad de drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs). A pesar de que la evidencia sobre su efectividad no es concluyente, los AINEs son utilizados como tratamiento de primera línea contra el dolor ya que poseen escasas limitaciones (55).

A continuación se detalla una breve descripción de los tratamientos mencionados previamente:

ANTICONCEPTIVOS ORALES COMBINADOS

Consisten en una combinación de estrógenos y progesterona que inhibe la ovulación, disminuyen los niveles de gonadotrofinas, reducen el flujo menstrual y causan la decidualización de las lesiones endometriósicas (56). Además, nuestro grupo demostró que estos compuestos disminuyen la proliferación celular e inducen la apoptosis en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis (57).

Pueden administrarse de manera cíclica o continua. Existe controversia en cuanto a la administración cíclica de estos compuestos ya que la presencia de sangrado uterino mensual conduce al riesgo de reflujo de células endometriales a la cavidad abdominal. Otro aspecto a tener en cuenta es el componente estrogénico de los anticonceptivos que podría resultar en la estimulación de la enfermedad. Se los utiliza como opción terapéutica en pacientes jóvenes, que no buscan el embarazo, ya que se los puede administrar a largo plazo.

AGENTES ANDROGÉNICOS

El Danazol fue la primera droga aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos para tratar la endometriosis. Se trata de un derivado del esteroide sintético 17-α-etinil-testosterona. El Danazol y sus metabolitos suprimen levemente la secreción de gonadotrofinas por la hipófisis y en particular el pico de hormona luteinizante (LH) requerido para la ovulación (46). Debido a sus características androgénicas y anabólicas presenta numerosos efectos secundarios, entre los que se encuentran: aumento de peso, disminución de la libido, náuseas, vómitos, retención hídrica, fatiga, atrofia vaginal, acné, sofocos, hirsutismo, y reducción del tamaño de las mamas. También se ha reportado la ocurrencia de disfunción hepática (10).

En la actualidad su uso como agente para el tratamiento de la endometriosis es limitado como consecuencia de la aparición de otras terapéuticas con efectos secundarios menores.

La Gestrinona (derivado de la 19-nortestosterona), es un esteroide sintético antigonadotrófico, con capacidad agonista y antagonista de la progesterona, ligeramente androgénico y antiestrogénico. Su uso es limitado porque sumados a los efectos secundarios generados por su carácter androgénico, posee baja tolerabilidad, disminuye los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o colesterol bueno, y aumenta los niveles lipoproteínas de baja densidad (LDL) o colesterol malo (58).

PROGESTÁGENOS

Su mecanismo de acción consiste en la supresión del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal con la consecuente inhibición de la ovulación y la disminución de los niveles de estrógenos. También provoca la decidualización y atrofia del endometrio eutópico y ectópico y de las lesiones endometriósicas (59-61).

Las ventajas de estos agentes terapéuticos comparados con otros tratamientos consisten en que son más económicos, bien tolerados, tienen menos efectos adversos (aumento de peso, retención hídrica, metrorragia y depresión) y pueden administrarse por tiempos más prolongados (62). Sin embargo a pesar de mejorar la sintomatología de la endometriosis, no revierten la infertilidad.

AGONISTAS DE GNRH

El uso de los agonistas de GnRH se ha basado en la supresión de la función ovárica a través de la desensibilización y regulación negativa de los receptores de GnRH en la hipófisis, lo cual resulta en el bloqueo de la liberación de gonadotrofinas. De esta manera se alcanzan concentraciones de estrógenos similares a los niveles postmenopáusicos (54).

Poseen numerosos efectos secundarios entre los que se encuentran sofocones, sequedad vaginal, pérdida de la libido e inestabilidad emocional (4). Su uso durante períodos de tiempo prolongados está asociado a una disminución en la masa mineral ósea.

NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS

Dado que ninguna de las alternativas terapéuticas de las que se dispone actualmente es enteramente eficaz, la búsqueda de nuevos tratamientos médicos para la endometriosis continúa.

Sobre la base de los datos disponibles, los esfuerzos deberían estar dirigidos hacia la identificación de tratamientos capaces de prevenir el desarrollo de la enfermedad con un perfil de efectos secundarios favorable, bajos costos, y de fácil administración para permitir períodos de tratamiento largos.

Avances en los conocimientos sobre la fisiopatología de esta enfermedad han permitido que los investigadores contemplen nuevos mecanismos para su tratamiento. En los últimos años se han estado investigando como alternativas terapéuticas a los antagonistas de GnRH, los inhibidores de aromatasa, los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), antagonistas de progesterona, moduladores selectivos del receptor de estrógenos y del receptor de progesterona, agonistas del receptor de estrógenos beta, agentes inmunomoduladores e inhibidores de la angiogénesis (63-67) (Tabla 2).

Tabla 2. Nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la endometriosis. Modificada de (63).

Tipo de droga	Compuesto
Estrategia hormonal	
Antagonista de GnRH	*Cetrorelix*
Inhibidores de Aromatasa	*Letrozole, Anastrozole*
Agonistas de Progestágenos y Moduladores Selectivos del Receptor de Progesterona	*Tanaproget, Mifepristona, Asoprisnil*
Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos	*Raloxifeno, Genisteina*
Estrategia No Hormonal	
Antiangiogénicos	*Endostatina, TNP-470, Atorvastatina, Anginex, 2-methoxyestradiol*
Inmunomoduladores	*IL-2, IFN-α, IL-12, Loxoribine, Levamisol, Imiquimod, Leflunomida*
Inhibidores de COX-2	*Rofecoxib, Celecoxib, Indometacina, Naproxeno, Sulindac, Ibuprofeno, NS398*
Agonistas de PPAR-γ	*Ciglitazona, Rosiglitazona*
Inhibidores de TNF-α	*Receptor TNF tipo I soluble humano, Etanercept*

Se sabe que al igual que en el crecimiento tumoral, la angiogénesis resulta esencial para el mantenimiento y el desarrollo de lesiones endometriósicas en un sitio ectópico (68). Por esta razón, el uso de agentes antiangiogénicos fue una de las estrategias terapéuticas no hormonales más estudiadas en los últimos años para tratar este proceso patológico (69).

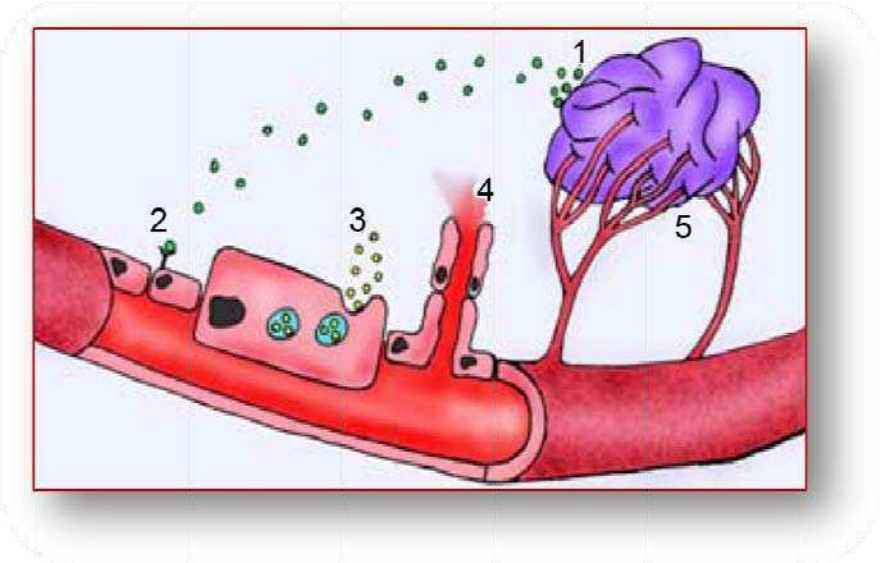
Ensayos clínicos en pacientes que padecían cáncer han demostrado en los últimos años que modalidades antiangiogénicas, implementadas solas o en combinación con quimioterapia, mejoran la calidad de vida aumentando la supervivencia (70).

ANGIOGÉNESIS Y ENDOMETRIOSIS

La angiogénesis es un proceso fisiológico mediante el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de una vasculatura preexistente (13). Mientras que la angiogénesis fisiológica tiene lugar principalmente durante la cicatrización de heridas y durante el ciclo menstrual del tracto reproductivo femenino (71), la angiogénesis patológica se asocia a enfermedades tales como el cáncer, la artritis reumatoidea, la retinopatía diabética y la endometriosis.

Las respuestas angiogénicas implican una cascada de eventos bioquímicos y moleculares que resultan en un proceso celular coordinado que involucra la proliferación y migración direccional de las células endoteliales, la degradación de la membrana basal, el remodelamiento de la matriz extracelular por metaloproteinasas, la formación de túbulos, el reclutamiento de pericitos y finalmente la maduración de los nuevos vasos (72).

Resulta de amplio conocimiento que éste proceso angiogénico es un prerrequisito para el desarrollo de la endometriosis. Según la teoría de Sampson, los fragmentos de endometrio alojados en un sitio ectópico requieren del establecimiento de un nuevo suministro sanguíneo para la supervivencia de los implantes y el desarrollo de la enfermedad (69,73) (Esquema 3).



Esquema 3. Cascada de eventos que ocurren durante la angiogénesis de la lesión endometriósica. El tejido endometrial ectópico secreta factores de crecimiento angiogénicos que difunden hacia tejidos cercanos (1). Estos factores interactúan con receptores específicos presentes en la superficie de las células endoteliales de vasculaturas preexistentes y las activan (2). La señal que se traduce en la célula endotelial activada comienza con la expresión de metaloproteinasas (3). Estas enzimas degradan la matriz extracelular, de la cual se liberan más factores de crecimiento, favoreciendo la proliferación y migración de las células endoteliales (4). Finalmente, dan lugar a estructuras tubulares que se unen a los vasos sanguíneos vecinos y son estabilizados por células musculares especializadas (pericitos) dando lugar a una nueva red vascular que alimenta la lesión (5). Tomada de (74).

En este proceso dinámico y complejo que involucra diversos factores, uno de los principales involucrados en la neovascularización del tejido endometrial ectópico es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), el cual no sólo sería producido por el mismo tejido endometrial sino también por los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal (75). Muchos estudios han demostrado que el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis contiene niveles significativamente mayores de VEGF (76). Además se observó que la expresión de este factor se encuentra aumentada en el endometrio eutópico y ectópico de estas pacientes respecto de las mujeres sanas (77,78).

Se conocen distintos factores que pueden promover la expresión de VEGF, entre los cuales se encuentran los estrógenos, la prostaglandina E_2 y la interleuquina 1β (79-81), los cuales juegan un papel importante en la patogenia de la enfermedad. La IL-1β es una citoquina pleiotrópica que

tiene potentes efectos proinflamatorios. Se ha visto que su expresión está aumentada en el endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis comparado con el de las mujeres sanas, y que los macrófagos del endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis expresan mayores niveles de esta citoquina que los del endometrio de mujeres sanas (82,83). De esta manera la producción elevada de estrógenos, IL-1β y prostaglandinas también estimula la producción de VEGF y la vascularización de las lesiones endometriósicas.

TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS

El uso de inhibidores de la angiogénesis resulta un tratamiento potencial para enfrentar desórdenes relacionados a este proceso (72). Como mencionamos previamente, la angiogénesis depende principalmente de la activación, proliferación, adhesión, migración y maduración de las células endoteliales. Por este motivo, existe un amplio espectro de estrategias para modular este proceso. Muchos de los métodos en investigación están enfocados a intervenir con la funcionalidad de la célula endotelial, en alguna de las etapas que tienen lugar durante la formación del vaso sanguíneo.

La relación entre el VEGF y la angiogénesis patológica en endometriosis ha sido estudiada durante los últimos años y se han realizado diversas investigaciones que buscaban antagonizar su acción con receptores solubles truncados de VEGF (84), anticuerpos específicos contra VEGF-A (84,85), y otros agentes angiostáticos (TNP-470, caplostatina, endostatina, angiostatina, anginex, atorvastatina) (81,85-89). En todos los casos, se reportó una supresión efectiva del crecimiento de los implantes endometriales. Sin embargo, estos estudios se realizaron en un modelo *in vivo* en el cual se implanta endometrio humano en ratones inmunodeficientes, sin considerar el importante rol que el sistema inmunológico juega en el desarrollo de esta enfermedad (90-93).

Hasta el momento no se reportaron estudios en humanos, probablemente debido al patrón desfavorable de potenciales efectos secundarios de estos compuestos (94). Existe sólo un estudio piloto en pacientes en el que se utilizó talidomida como inhibidor angiogénico. Los resultados sugieren que este compuesto podría ser efectivo en el tratamiento de mujeres con endometriosis recurrente (95), sin embargo estos resultados no son concluyentes (96).

Uno de los inhibidores de la angiogénesis más novedoso que está siendo utilizado en la actualidad como terapia adyuvante en algunos tipos de cáncer, como por ejemplo el colorrectal y el de mama, es el bevacizumab (97,98).

BEVACIZUMAB

El bevacizumab es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado recombinante que se une al VEGF e inhibe su actividad biológica. Este anticuerpo fue construido ensamblando los residuos de unión a VEGF-A del anticuerpo neutralizante murino (MabA.4.6.1.) en el marco de una inmunoglobulina humana (99). Este compuesto antiangiogénico ha demostrado una alta eficacia en el tratamiento de diversos tumores (100-106), y recientemente fue aprobado por la FDA como el tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer colorrectal metastásico (107,108). Se ha visto que la adición de bevacizumab a la quimioterapia del cáncer colorrectal metastásico prolongó la media de sobrevida libre de progresión (PFS) en 5 ensayos clínicos que involucraban 3101 pacientes (109). Actualmente se encuentra en fase III para el tratamiento de cáncer ovárico (110-112).

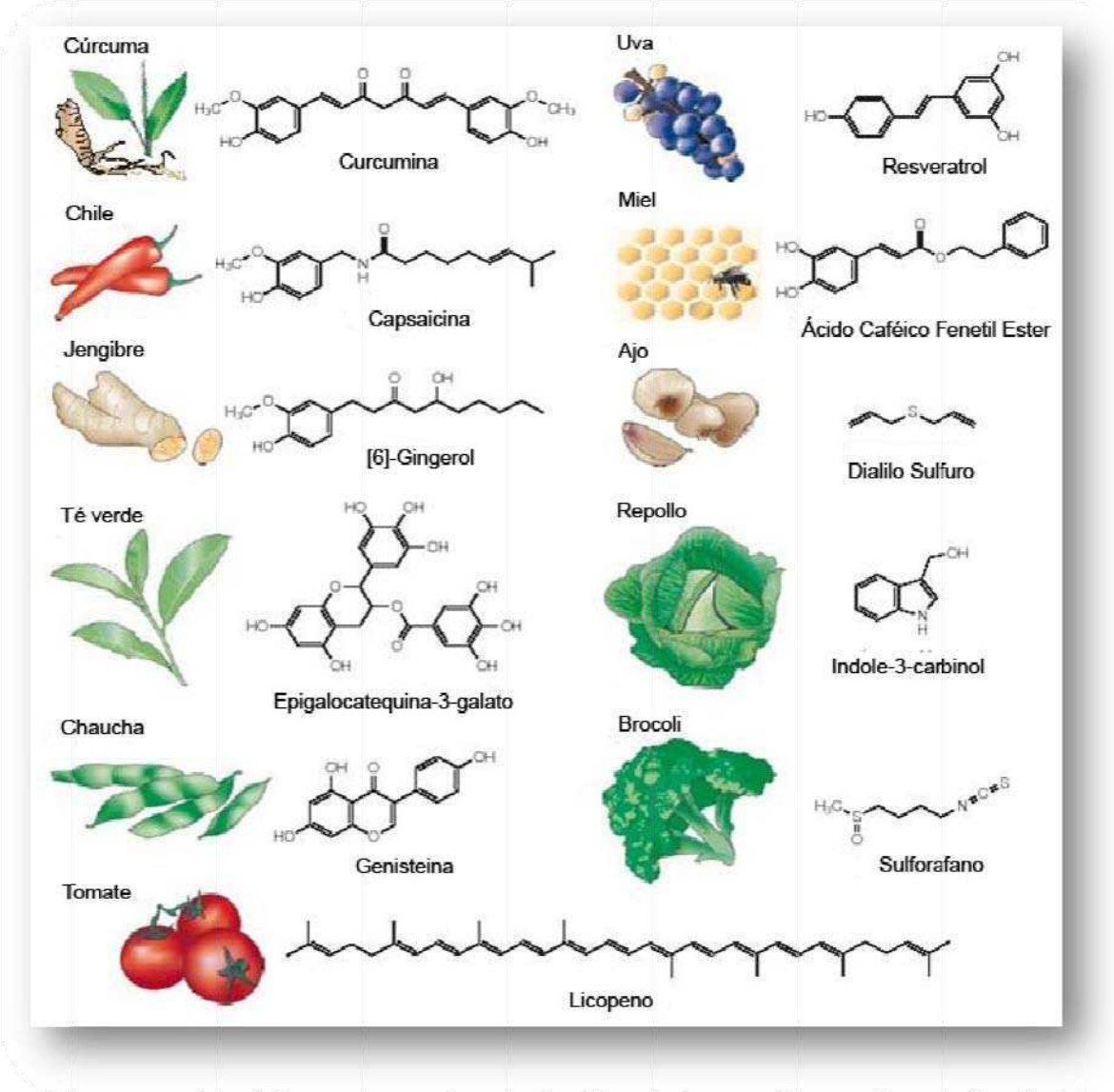
Sin embargo, a pesar de lo promisorios que puedan parecer estos compuestos, hay que tener en cuenta que la angiogénesis es un proceso fundamental para la ovulación, la formación del cuerpo lúteo, la implantación del embrión y el desarrollo fetal (113). Dado que la endometriosis se presenta durante el período reproductivo es necesario que los agentes antiangiogénicos que se utilizarían para su control, posean una acción selectiva sin la disrupción de las funciones reproductivas.

A pesar de la diversidad de terapias que están siendo investigadas, aún se resalta la necesidad de opciones eficientes e inocuas a largo plazo para el tratamiento de los síntomas asociados a la endometriosis. Una de las principales tareas sería la de encontrar alternativas terapéuticas que además sean capaces de conservar un ciclo menstrual normal que permita el embarazo. En otras palabras, no deberían interferir con los mecanismos fisiológicos de la fertilidad (tanto a nivel ovárico como endometrial) ni ser embriotóxicos o teratogénicos.

TERAPIAS NATURALES

En los últimos años se comenzó a estudiar el uso de hierbas medicinales y productos botánicos para controlar los síntomas de diversos desordenes ginecológicos (114,115). Actualmente muchos compuestos naturales encontrados en alimentos y plantas (Esquema 4) que suelen ser utilizados cotidianamente como suplementos nutricionales, están siendo considerados para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, la cual comparte importantes

similitudes con la endometriosis (tejidos propios modificados con capacidad de migrar y formar focos en otros sitios), a pesar de tratarse de una enfermedad benigna (116).



Esquema 4. Fitoquímicos representativos con función quimiopreventiva y sus fuentes dietarias.

Modificada de http://www.nutrizionistatosi.com

Muchos de esos fitoquímicos poseen capacidades anticarcinogénicas (117-120) y antiangiogénicas (121-123) experimentalmente demostradas, aunque en la mayoría de los casos su efectividad aún no ha sido comprobada clínicamente (124).

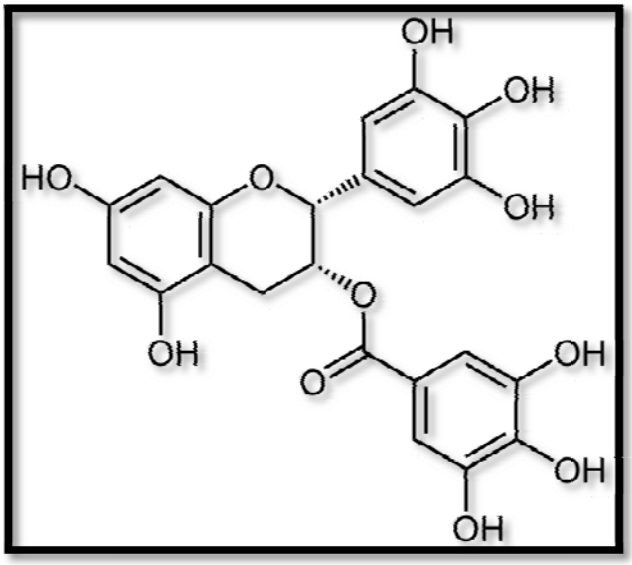
En vista de la necesidad de alternativas para controlar el dolor, la medicina alternativa y complementaria como el uso de hierbas medicinales y otros compuestos botánicos con propiedades antiinflamatorias, podrían resultar particularmente efectivas en el tratamiento de los síntomas asociados a la endometriosis. De esta manera, las terapias alternativas para el tratamiento del dolor han ganado popularidad particularmente entre mujeres con endometriosis (125). Recientemente se incorporó la propuesta de usar hierbas chinas medicinales para tratar la endometriosis (126) y existen algunos trabajos que demuestran la capacidad inhibitoria de algunos fitoquímicos y/o vitaminas, sobre el desarrollo de lesiones endometriósicas (127-132).

Los beneficios que brindan a la salud el consumo moderado de té verde, vino tinto, ajo y frutas, entre otros, han sido descriptos por años y su eficacia en la prevención de enfermedades fue confirmada por distintos estudios moleculares (133,134). Se sabe que las catequinas en el té verde y los polifenoles en el vino tinto, son responsables de los beneficios observados con estos productos, que forman parte de nuestros hábitos alimenticios cotidianos.

GALATO DE EPIGALOCATEQUINA (EGCG)

El té constituye, luego del agua, la segunda bebida más popular mundialmente (135). Se consume en diferentes partes del mundo como té negro, oolong y/o verde. Las tres variedades resultan de distintos procesamientos y oxidación de las hojas de la planta *Camellia sinensis*, que contiene alto potencial nutracéutico (136). Sin embargo el té verde resultó ser el más estudiado por su uso en quimioprofilaxis y su contribución en la prevención de enfermedades degenerativas (133). Los componentes activos del té verde, son un grupo de compuestos polifenólicos conocidos como catequinas, las cuales se encuentran en distinta proporción: epicatequina (EC), galato de epicatequina (ECG), epigalocatequina (EGC), y galato de epigalocatequina (EGCG).

El EGCG (Esquema 5) es la catequina más abundante presente en el té verde, constituyendo más del 50% de la catequina total (136). Dado que evidencia ser la más poderosa en su acción y la responsable de los beneficios atribuibles al consumo de té verde, ha sido considerada en los últimos años para el tratamiento de distintas enfermedades basándose en sus efectos antioxidantes, antiangiogénicos y antiproliferativos (133,137). Sus propiedades antimitóticas condujeron a la idea de que el EGCG sería útil en el tratamiento de la endometriosis. Por otra parte, la actividad antiangiogénica del EGCG fue demostrada hace varios años *in vitro* e *in vivo* (138,139).



Esquema 5: Estructura química del EGCG

Varios grupos han demostrado recientemente la capacidad del EGCG para inhibir la proliferación e inducir la muerte celular de distintos tipos celulares humanos, como por ejemplo células de cáncer ovárico (140), células de leiomioma (141,142) y células de cáncer cervical (143), entre otros.

RELEVANCIA DEL TRATAMIENTO CON EGCG EN PACIENTES

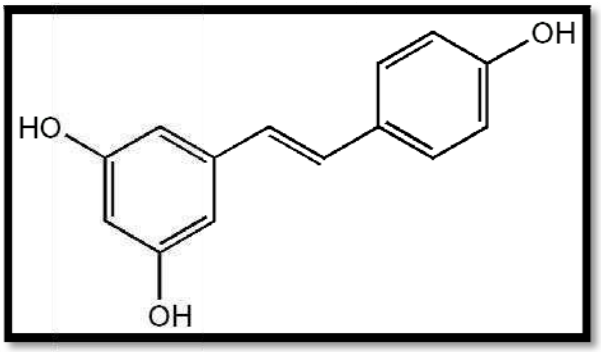
Hoy en día el té verde es considerado uno de los principales agentes dietarios con potencial beneficio sobre la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, motivo por el cual está siendo ampliamente estudiado a nivel mundial.

Se han realizado ya varios ensayos clínicos en pacientes sobre el efecto de la administración de EGCG en cápsulas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (144,145) y ha demostrado poseer actividad preventiva en cáncer de próstata (146-148), cáncer de mama (149,150), cáncer colorrectal (151) y en lesiones cervicales de HPV carcinogénico (152), entre otros.

RESVERATROL

Otra alternativa natural que está siendo estudiada actualmente en el tratamiento del cáncer, es el uso del resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) (Esquema 6) (120,153). Se trata de una fitoalexina que se encuentra en altas concentraciones en las uvas, frutos rojos, nueces y vino tinto, ente otros (134).

Usualmente las plantas producen una notable variedad de compuestos de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios (no esenciales en el metabolismo básico de la planta). Con frecuencia estas moléculas desempeñan un papel en la defensa frente a condiciones climáticas estresantes (radiación UV, ozono, etc.) o infecciones patológicas. Existen dos clases de moléculas secundarias antimicrobianas: fitoalexinas y fitoanticipinas. Las fitoalexinas son compuestos sintetizados *de novo* en respuesta al ataque patógeno, mientras que las fitoanticipinas se acumulan constitutivamente en la planta como inhibidores de infecciones prefabricados (134).



Esquema 6: Estructura química del resveratrol

Se ha descripto que este polifenol protege a los vasos de la arteriosclerosis, inhibe la agregación plaquetaria y reduce la síntesis de eicosanoides (154). Asimismo, en los últimos años, se demostró que inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis de diversos tumores, así como también inhibe el proceso de angiogénesis (121,123,155-157).

Hasta el momento, el efecto del resveratrol no ha sido estudiado en el tratamiento de la endometriosis. Sólo un estudio reciente realizado en un modelo de endometriosis en ratones inmunodeficientes advierte sobre la eficacia de esta alternativa terapéutica (158).

RELEVANCIA DEL TRATAMIENTO CON RESVERATROL EN PACIENTES

Durante la última década, el resveratrol se ha convertido en uno de los compuestos naturales más prometedores, con enorme potencial terapéutico. Sin embargo, a pesar de los diversos reportes que han descripto la farmacocinética del resveratrol en modelos animales (159), se encuentran pocos estudios similares realizados en humanos al día de hoy. Existen algunos ensayos clínicos en curso (fase I/II) que estudian el efecto del resveratrol en la prevención del cáncer de colon y el linfoma con resultados promisorios (118,160).

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

La angiogénesis juega un rol crítico en la fisiología de células normales y patológicas. Una angiogénesis excesiva o anormal está asociada al cáncer o a otras enfermedades tales como artritis reumatoidea, retinopatía diabética, endometriosis y obesidad.

Por este motivo, en los últimos años se ha planteado el uso de inhibidores de la angiogénesis como alternativa terapéutica para tratar la endometriosis. De esta manera, al interferir con el suministro sanguíneo de las células endometriales remanentes que escaparon al sistema inmunológico, impedirían el desarrollo de las lesiones endometriósicas en un sitio ectópico.

Frecuentemente las pacientes con endometriosis acuden a su médico una vez que los síntomas se manifiestan, y por lo general, las lesiones ya se han establecido para entonces. Por lo tanto, consideramos oportuno evaluar tratamientos que tengan como blanco inhibir el crecimiento y mantenimiento de lesiones ya establecidas.

Así es que una terapia antiangiogénica también podría plantearse con el fin de evitar la recurrencia de la enfermedad, siendo hoy uno de los principales objetivos en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Como primer objetivo general nos propusimos *estudiar dos terapias antiangiogénicas en un modelo de endometriosis experimental in vivo.*

Otro objetivo importante a la hora de buscar nuevas terapias, es el de reducir los efectos secundarios y encontrar opciones que permitan tratamientos prolongados. Actualmente, la tendencia propone incorporar compuestos naturales presentes en alimentos que forman parte de nuestra dieta, como tratamiento para diversas enfermedades o como refuerzo de otros tratamientos.

Basándonos en las propiedades quimiopreventivas descriptas para catequinas presentes en el té verde y polifenoles presentes en el vino tinto, y considerando que estos compuestos pueden mediar mecanismos antiproliferativos y proapoptóticos, nos propusimos como segundo

objetivo general *evaluar el efecto de tratamientos naturales con resveratrol y EGCG, en modelos de endometriosis experimental, in vivo e in vitro.*

Cabe destacar que confirmar los efectos beneficiosos de estas terapias en el tratamiento de la endometriosis estaría sustentando la posibilidad de ofrecer compuestos naturales a las pacientes que podrían ser administrados a largo plazo por sus escasos efectos colaterales. Por otra parte, existen evidencias de que el EGCG y el resveratrol funcionan como inhibidores angiogénicos orales (138,156).

Por otra parte, dada la importancia del proceso de angiogénesis en el desarrollo de esta patología, nos propusimos como último objetivo *conocer de qué manera influyen el tejido endometrial ectópico y los factores presentes en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis sobre la migración de células endoteliales endometriales,* con la idea de lograr una mayor comprensión del proceso que conduce al establecimiento de estas lesiones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Estudiar la producción de VEGF *in vitro* por macrófagos peritoneales en un modelo experimental de endometriosis en ratones.**

  a) Analizar por medio de la técnica de ELISA los niveles de VEGF liberados en cultivos de macrófagos peritoneales extraídos de ratones con y sin endometriosis.

- **Evaluar el efecto *in vivo* de dos terapias antiangiogénicas, con bevacizumab y un anticuerpo policlonal dirigido contra VEGF murino, sobre el desarrollo de la endometriosis en un modelo experimental en ratones BALB/c.**

  a) Evaluar el número y el tamaño de las lesiones endometriósicas desarrolladas, y analizar si las terapias actúan a través de la proliferación celular, la densidad vascular y la apoptosis de las mismas.
  b) Evaluar los niveles de VEGF en el líquido peritoneal de los animales.

- **Evaluar el efecto *in vivo* de dos terapias naturales, con resveratrol y EGCG, sobre el desarrollo de la endometriosis en un modelo experimental en ratones BALB/c.**

  a) Evaluar el número y el tamaño de las lesiones tipo endometriósicas desarrolladas, y analizar si las terapias actúan a través de la proliferación celular, la densidad vascular y la apoptosis de las mismas.
  b) Evaluar los niveles de VEGF en el líquido peritoneal de los animales.

- **Evaluar el efecto directo del resveratrol y el EGCG, *in vitro*, sobre la supervivencia de células epiteliales endometriales humanas provenientes de pacientes con endometriosis y mujeres controles.**

  a) Evaluar la proliferación celular y la apoptosis en cultivos primarios de células epiteliales endometriales humanas tratados con distintas dosis de resveratrol y EGCG.

- **Estudiar el efecto del resveratrol sobre la migración de una línea de células endoteliales endometriales humanas (HEEC).**

- **Estudiar el efecto de los factores liberados por el tejido endometrial y el ambiente peritoneal sobre el comportamiento migratorio de las células endoteliales endometriales.**

  a) Establecer una comparación en la respuesta migratoria de la línea HEEC en presencia de medios condicionados de tejido endometrial eutópico proveniente de mujeres controles y pacientes con endometriosis.
  b) Evaluar la respuesta migratoria de la línea HEEC en presencia de medios condicionados de tejido endometrial ectópico proveniente de pacientes con endometriosis.
  c) Evaluar la respuesta migratoria de la línea HEEC en presencia del líquido peritoneal de pacientes con endometriosis y mujeres controles.

MATERIALES Y MÉTODOS

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

ANIMALES

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 2 meses de edad del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum*, bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de 22 ºC y humedad constante. El manejo de los animales siguió las normas especificadas por la Guía del NIH para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

CIRUGÍA

A todos los animales se les indujo lesiones de tipo endometriósicas por medio del transplante de uno de los cuernos uterinos al mesenterio del intestino, como se ha descripto previamente (161). Brevemente, los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal con una inyección de ketamina (100mg/kg peso) / xilacina (10mg/kg peso) y se les realizó una incisión medioventral para exponer el útero y los intestinos. Se extirpó el cuerno uterino derecho y se colocó en medio estéril DMEM-F12 (Gibco). Luego se abrió longitudinalmente para exponer el tejido endometrial, y se cortó en fragmentos de aproximadamente 4 mm^2. Posteriormente se suturaron 3 fragmentos al mesenterio del intestino con un único punto de sutura utilizando hilo no reabsorbible (Supralon, Ethicon) y se cerró el abdomen.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales se distribuyeron al azar en distintos grupos experimentales y se les indujo endometriosis quirúrgicamente. Los tratamientos se iniciaron a los 15 días post-cirugía para estudiar el efecto de los mismos sobre el mantenimiento y el desarrollo de las lesiones ya

establecidas. Los animales fueron monitoreados diariamente a lo largo del experimento. No se encontraron evidencias de toxicidad a las dosis administradas basándonos en el peso corporal, el consumo de comida, el comportamiento y los niveles de actividad de los animales tratados comparados con los controles.

TRATAMIENTOS ANTIANGIOGÉNICOS

Anti-VEGF murino

El tratamiento consistió en una inyección intraperitoneal semanal de 5 mg/kg de anticuerpo murino policlonal (donado por el laboratorio del Dr. Alberto Baldi) en buffer fosfato salino durante 2 semanas. El grupo control recibió inyecciones de vehículo. Ambos grupos (control y tratado) se formaron con 12 animales cada uno.

Bevacizumab

El tratamiento consistió en una inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de bevacizumab (Avastin®-Roche, Argentina) en solución salina, cada 3 días durante 2 semanas (162,163). El grupo control recibió inyecciones de vehículo bajo el mismo patrón. Ambos grupos (control y tratado) se formaron con 12 animales cada uno.

TRATAMIENTOS NATURALES

Resveratrol

El resveratrol (Sigma Aldrich) se disolvió en etanol 100% para alcanzar una solución stock de 50 mg/ml, según las indicaciones del fabricante. Veintinueve animales fueron asignados al azar en 3 grupos experimentales: Res I (resveratrol 10 mg/kg en agua), Res II (resveratrol 25 mg/kg en agua) y Control (etanol 10%). El tratamiento consistió en inyecciones intraperitoneales diarias durante 4 semanas.

Galato de epigalocatequina (EGCG)

El EGCG (Sigma-Aldrich) se disolvió en agua para alcanzar una solución stock de 20 mg/kg. Veintisiete animales se distribuyeron al azar en 3 grupos experimentales: EGCG I (20 mg/ml en agua), EGCG II (100 mg/kg en agua) y Control (agua). El tratamiento se administró por vía oral, con la ayuda de una sonda esofágica, diariamente durante 4 semanas.

EVALUACIÓN DEL CICLO ESTRAL

Los grupos tratados con los compuestos naturales fueron ciclados una vez al día para evaluar el efecto de estas terapéuticas sobre el ciclo estral. Para ello se introdujo una pipeta pasteur descartable con 1 ml de solución salina en la vagina y se tomó una muestra con la cual se realizó un frotis. Posteriormente se observó la muestra al microscopio para identificar por su citología en qué etapa del ciclo estral se encontraban.

EVALUACIÓN DEL TEJIDO ECTÓPICO

Una vez concluido el tiempo correspondiente a cada tratamiento, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal, se localizaron las lesiones endometriósicas y se determinó su volumen según la fórmula de $V= 4/3.\pi.r^2.R$ (164), midiendo los diámetros mayor (D) y menor (d) con un calibre y calculando los radios correspondientes. Luego las lesiones fueron removidas y fijadas en paraformaldehído al 10%.

El tejido ectópico fijado se incluyó en parafina, se cortó en secciones de 5 µm de espesor y se tiñó con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron examinados para confirmar la presencia de tejido endometrial.

INMUNOHISTOQUÍMICA - EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA VASCULARIZACIÓN

Los cortes seriados del tejido ectópico se sometieron a procedimientos estándar de inmunohistoquímica para evaluar los niveles de proliferación celular y vascularización presentes

en las lesiones endometriósicas.

La proliferación celular se analizó a través de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), también llamado ciclina. PCNA es una proteína auxiliar de la ADN polimerasa delta de 36 KD que se usa como marcador de proliferación en estudios inmunohistoquímicos debido a que su expresión se correlaciona con el estado proliferativo de la célula (165).

La densidad vascular de las lesiones se evaluó a través del CD34, conocido marcador de células endoteliales (166,167).

Para ello, luego de los protocolos estándar de desparafinización y rehidratación, se prosiguió con la clásica exposición de antígenos con buffer citrato, la inactivación de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno y el bloqueo de sitios inespecíficos con albúmina de suero bovino (BSA). Luego los cortes se incubaron durante la noche a 4ºC con el anticuerpo primario (policlonal anti-PCNA de ratón hecho en conejo, 1:300, Santa Cruz; ó monoclonal anti CD34 de ratón hecho en rata, 1:50, Abcam). Luego, se trataron durante 60 minutos a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado (anticuerpo anti-IgG de conejo, 1:200, Sigma-Aldrich Co.; ó anticuerpo anti-IgG de rata 1:500, Sigma-Aldrich Co.) seguido de la incubación con estreptavidina-peroxidasa (Dako). La marca se observó luego de tratar los cortes con diaminobencidina (DAB) y de realizar una leve contratinción nuclear con hematoxilina, antes del montaje. Como control negativo, una inmunoglobulina de la misma clase y concentración se utilizó en reemplazo del anticuerpo primario. El control negativo no mostró marca en ninguno de los casos.

Las células positivas para PCNA se identificaron con un microscopio óptico de campo claro (400X de magnificación) por la presencia de un precipitado nuclear marrón. Se contaron un total de 300 células epiteliales elegidas al azar en 10 campos representativos, y se calculó el porcentaje de células del epitelio glandular positivas para PCNA por animal (considerando todas las lesiones desarrolladas). Luego los porcentajes se utilizaron para obtener la media de cada grupo experimental.

El porcentaje de área total que expresaba inmunoreactividad para CD34 se estableció analizando 10 campos representativos de las lesiones de cada animal con el software ImageJ 1.33u (NIH). El porcentaje de área positiva para CD34 se determinó por campo y se promedió por animal. Todos los porcentajes fueron utilizados para calcular la media del grupo experimental.

EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS

Sobre cortes histológicos del tejido ectópico, se evaluó también la presencia de núcleos apoptóticos mediante la técnica de marcación terminal con dUTP-digoxigenina mediada por TdT (TUNEL) (168). Para ello se utilizó el kit Apoptag Plus S7101 (Chemicon) que se fundamenta en la localización y marcación de los extremos 3'-OH que se generan por la fragmentación del ADN en las células apoptóticas (169). Los cortes se trataron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones se desparafinaron con xileno, se rehidrataron y se permeabilizaron con 20 µg/ml de Proteinasa K (Gibco). La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno 3%, luego se incubó una hora a temperatura ambiente con la enzima TdT y nucleótidos marcados con digoxigenina. A continuación se incubó con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa, seguido del sustrato de la peroxidasa, DAB. Finalmente se realizó una tinción de contraste con hematoxilina. Los controles positivos fueron suministrados por el fabricante del kit y los controles negativos se obtuvieron sometiendo cortes al mismo procedimiento pero sin el agregado de la enzima TdT. Los preparados fueron evaluados al microscopio óptico con 400X de magnificación para determinar el porcentaje de células apoptóticas del epitelio glandular de las lesiones, calculado sobre un total de 300 células elegidas al azar.

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE VEGF

Una vez finalizados los tratamientos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se colectaron los líquidos peritoneales por lavado de la cavidad abdominal con 1,5 ml de solución salina. Luego fueron centrifugados a 4ºC durante 10 minutos y a 1500 rpm, y los sobrenadantes fueron conservados a -20ºC hasta la determinación de los niveles de VEGF.

La cuantificación de los niveles de VEGF se realizó mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (78,79), utilizando un kit comercial (R&D Systems). El nivel de sensibilidad fue de 3 pg/ml. La variabilidad intra-ensayo fue de ± 4,3% mientras que la inter-ensayo fue ± 5,7%. Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

CULTIVOS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DEL MODELO DE ENDOMETRIOSIS MURINO

Se evaluó la producción de VEGF de macrófagos peritoneales provenientes de ratones con y sin endometriosis.

Para ello se utilizaron 24 ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad y se dividieron en 3 grupos experimentales: endometriosis (EDT), sham y controles. Al grupo EDT se les indujo endometriosis quirúrgicamente como se explicó previamente, al grupo sham se les realizó la misma intervención quirúrgica con la salvedad de que no se suturaron los fragmentos de cuerno uterino pero sí se realizaron los puntos de sutura, y el grupo control no recibió ninguna intervención.

A los 30 días de inducida la enfermedad en el grupo EDT, se sacrificaron los animales y se extrajeron los macrófagos peritoneales. Brevemente, se inyectaron 3 ml de solución fisiológica estéril con 0.02% de EDTA, se masajeó el abdomen de los animales por unos minutos y se sacrificaron por dislocación cervical. Luego se extrajo el líquido peritoneal a través de un orificio abdominal y se centrifugó a 4ºC y 1500 rpm para separar las células.

Se sembraron 500.000 células por pocillo de labtek de vidrio (Nunc) en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% SFB. Luego se incubó 1 hora a 37ºC para que se adhieran los macrófagos y se procedió con sucesivos lavados con PBS para purificar el cultivo.

Finalmente, se incubaron en estufa gaseada a 37°C por 24 h en medio RPMI 1640 suplementado con 2,5% SFB. Transcurrida la incubación, se recuperaron los medios condicionados y se centrifugaron a 4ºC y 1500 rpm para descartar el sedimento celular.

Posteriormente se evaluaron los niveles de VEGF en los medios condicionados mediante la ténica de ELISA explicada previamente.

Para determinar la pureza del cultivo, los macrófagos se detectaron por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-F4/80 (eBioscience). Se logró una pureza del 90% en todos los cultivos.

PACIENTES

En este trabajo participaron mujeres en edad reproductiva, con ciclos ovulatorios regulares, que se sometieron a laparoscopía diagnóstica por infertilidad. Dichas mujeres se clasificaron en dos grupos: pacientes con endometriosis (estadios I y II) y mujeres controles.

El primer grupo fue formado por pacientes diagnosticadas con endometriosis laparoscópicamente y confirmadas histológicamente, según la Clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (6), que no habían recibido ningún tipo de tratamiento médico para la endometriosis durante los 6 meses previos al estudio. El grupo control consistió en mujeres que se sometieron a laparoscopias diagnósticas por dolor pélvico agudo, obstrucción de trompas o infertilidad, y que no padecían endometriosis u otra patología de origen no infeccioso ni oncológico que pudiera alterar la población celular a evaluar.

Previo consentimiento escrito de las pacientes, se extrajeron biopsias de endometrio (eutópico y/o ectópico) en fase proliferativa durante las laparoscopias y se depositaron en tubos de ensayo con medio de cultivo MEM D-Val (Gibco) en condiciones de esterilidad, como se ha descripto previamente (168). Las muestras se trasladaron al laboratorio y se procesaron dentro de las 24 horas de culminada la cirugía.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES DE ENDOMETRIO HUMANO

A partir de las biopsias de endometrio se realizaron cultivos primarios de células epiteliales endometriales. Se disgregó el tejido y se cultivó la fracción epitelial siguiendo técnicas de cultivo ya descriptas (168,170). Brevemente, luego de la disgregación con material de cirugía se colocó la muestra en medio de cultivo MEM Eagle D-Valine modificado con L-Glutamine (USBiological) con 1 mg/ml de colagenasa tipo I (Gibco) y se incubó durante dos horas en estufa gaseada a 37ºC y 5% CO_2. Transcurrida la colagenización se centrifugó la suspensión de células a 100 g durante 5 minutos, se separó el sedimento (conteniendo las glándulas endometriales) del sobrenadante, se resuspendió en medio de cultivo básico y se centrifugó nuevamente a 100 g durante 5 minutos. El sedimento final contenía mayoritariamente células epiteliales, las cuales se cultivaron en condiciones basales con MEM Eagle D-Valine modificado con L-Glutamine (USBiological)

suplementado con 10% SFB (Gibco) y se incubaron en estufa gaseada a 37ºC por 48 o 72 horas, hasta alcanzar un 80% de confluencia.

El grado de pureza de los cultivos primarios se evaluó, por la presencia de citoqueratina (proteína típica de la fracción epitelial) mediante inmunocitoquímica en el laboratorio en ocasiones previas, y se demostró que éste método garantiza una pureza del 85-90% (170).

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CULTIVOS DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES HUMANAS

Luego de purificar las células epiteliales endometriales, se sembraron 50.000 células por pocillo en placas plásticas de 96 pocillos (Corning Inc.) y se incubaron en condiciones basales. Luego de 48 horas se lavó el cultivo con buffer fosfato salino (PBS) y se agregaron los distintos tratamientos al medio de cultivo fresco MEM Eagle D-Valine modificado con L-Glutamine suplementado con 2,5% SFB: resveratrol (0, 25, 50 y 100 µM) ó EGCG (0, 20, 40, 80 y 100 µM). Ambos compuestos fueron reconstituidos en dimetilsulfoxido (DMSO) y el basal (0 µM) consistió en la concentración final de DMSO utilizada como vehículo.

Las células se incubaron con los estímulos por otras 24 horas y se evaluaron los índices de proliferación celular utilizando el kit de reducción de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-5-(3-carboxi metoxi fenil) -2-(4-sulfo fenil)-2H-tetrazolio (MTS), CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega). Con la ayuda de un lector de Elisa se evaluó el resultado colorimétrico y se determinó el porcentaje de células en proliferación respecto del basal.

En este experimento participaron 31 mujeres: 15 controles y 16 pacientes con endometriosis.

EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR EN CULTIVOS DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES HUMANAS

Luego de purificar las células epiteliales endometriales, se sembraron 100.000 células por pocillo en labtek de permanox de 8 pocillos (Nunc) y se incubaron en condiciones basales. Luego de 48 horas se lavó el cultivo con PBS y se agregaron distintas dosis de resveratrol (0, 25, 50 y 100 µM) ó EGCG (0, 20, 40, 80 y 100 µM) al medio de cultivo fresco suplementado con 2,5% SFB.

Ambos compuestos fueron reconstituidos en DMSO y el basal (0 µM) consistió en la concentración final de DMSO utilizada como vehículo.

Las células se incubaron con los estímulos por otras 24 horas y se fijaron con paraformaldehído 4% para luego evaluar los índices de apoptosis celular utilizando un kit de TUNEL con fluoresceína (Roche). Luego de realizar una marcación nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia y se determinó la cantidad de núcleos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de un total de 300 núcleos marcados con DAPI. Para ello se consideraron células provenientes de aproximadamente 10 campos representativos.

En esta evaluación se analizaron 8 cultivos provenientes de mujeres controles y 7 provenientes de pacientes con endometriosis. Los datos se expresaron como porcentaje de células apoptóticas respecto del total.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES ENDOMETRIALES HUMANAS

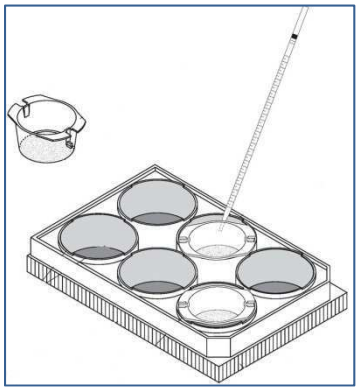
Se realizaron ensayos de migración celular utilizando una línea inmortalizada de células endoteliales de endometrio humano (HEECs), producida en el laboratorio del Dr. Gil Mor (Reproductive Immunology Unit, Yale School of Medicine) (171,172). Se trata de células endoteliales obtenidas de tejido endometrial humano e inmortalizadas a partir de una transformación mediada por la enzima de la telomerasa (173,174).

Las HEECs se mantuvieron en botellas de cultivo T25 previamente gelatinizadas (Gelatina 2%, Sigma-Aldrich Co.) con medio de crecimiento de células endoteliales (EGM)-2 bullet kit (Lonza), suplementado con 2 µl/ml de normocina (InvivoGen) y 80 ng/ml de puromicina (Sigma-Aldrich Co.), hasta alcanzar un 70% de confluencia. Todos los ensayos fueron realizados con pasajes entre 25 y 30 de la línea celular.

ENSAYOS EN PRESENCIA DE RESVERATROL

Una vez alcanzada la confluencia deseada, se lavaron las células con PBS y se incubaron en condiciones de hambreado de nutrientes, con medio de cultivo basal endotelial (EBM) sin suplementar en estufa gaseada a 37ºC durante la noche. Al día siguiente se levantaron las células con una solución de 0,05% Tripsina- 0,02% EDTA (Gibco), se centrifugaron a 1100 rpm y se

resuspendieron en medio EBM sin suplementar. Se sembraron 20.000 células por inserto de 8 µm de poro (Falcon) colocados en placa de 24 pocillos (Esquema 7). En la parte inferior de las placas se agregaron 500 µl de medio de cultivo EBM suplementado con distintas concentraciones de resveratrol (0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 µM).



Esquema 7. Sistema de migración por inserto de 8 µm de poro en placa de 6 pocillos. El medio de cultivo con los estímulos (500 µl) se coloca con la ayuda de una pipeta por el costado del inserto en el pocillo de la placa, y las células se siembran en suspensión (200 µl) sobre la membrana del inserto.

El sistema de migración se incubó por 20 horas en estufa gaseada a 37ºC. Luego se transfirió cada inserto a una placa de cultivo de 24 pocillos conteniendo 500 µl de cristal violeta 0,5% en metanol 20% y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. En esta incubación las células se fijan por acción del metanol y sus núcleos se tiñen con cristal violeta, lo cual facilita la identificación y el conteo posterior. Luego se retiró cada inserto, se limpió con agua corriente y se eliminó el excedente de células que no migaron de la cara superior con la ayuda de un hisopo. Las HEECs migradas que quedaron en la cara inferior del inserto se cuantificaron mediante el uso de microscopio invertido. Los resultados se expresaron como porcentaje de células migradas respecto del basal (0 µM).

ENSAYOS EN PRESENCIA DE MEDIOS CONDICIONADOS DE EXPLANTES DE TEJIDO ENDOMETRIAL

Previo consentimiento informado, durante las laparoscopías, se tomaron muestras de tejido endometrial ectópico y eutópico en pacientes con endometriosis, así como muestras de tejido eutópico en mujeres controles.

Dentro de las 24 horas de tomada la muestra se prosiguió con su procesamiento en el laboratorio. Brevemente, se pesó la biopsia en una balanza de precisión y se la cortó con la ayuda de una tijera estéril en pequeños trozos. Dichos fragmentos, de aproximadamente 0,1 g en todos los ensayos, se incubaron en estufa gaseada a 37°C en placas de 35 mm (Falcon) con 1 ml de medio EBM sin suplementar. El control de migración consistió en una placa con 1 ml de medio EBM sin explantes de tejido, incubada en las mismas condiciones. Transcurridas las 24 horas de incubación se retiro el medio condicionado (MC) de la placa, se centrifugó a 1500 rpm y se conservó el sobrenadante a -20°C hasta el momento del ensayo de migración.

Nuevamente, en el mismo sistema de migración explicado con anterioridad, se sembraron 20.000 HEECs por inserto en medio EBM, en presencia de medio EBM con 25% de MC de explantes de tejido endometrial o MC control en el compartimento inferior del sistema (pocillos de la placa).

En este análisis se utilizaron muestras de tejido endometrial ectópico y eutópico provenientes de 8 pacientes con endometriosis, y muestras de tejido eutópico de 6 mujeres controles. Los resultados se expresaron como células migradas totales.

ENSAYOS EN PRESENCIA DE LÍQUIDOS PERITONEALES DE PACIENTES

Previo consentimiento de las pacientes, se extrajo una muestra de líquido peritoneal durante las laparoscopías y se colocó en un tubo de 15 ml conservado a 4°C. Dentro de las tres horas de tomada la muestra, se centrifugó a 1500 rpm y se descartó el sedimento obtenido.

Utilizando el mismo sistema de migración explicado previamente, se sembraron 20.000 HEECs por inserto en medio EBM, en presencia de medio EBM con 25% de líquido peritoneal de pacientes con endometriosis o mujeres controles en el compartimento inferior del sistema (pocillos de la placa).

En este análisis participaron 8 mujeres control y 9 pacientes con endometriosis. Los resultados se expresaron como células migradas totales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se hizo utilizando el software GraphPad PRISM V4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Las comparaciones estadísticas entre dos grupos se hicieron mediante el test "t de Student", con corrección de Welch en grupos con varianzas significativamente diferentes y distribución gaussiana. De acuerdo a la distribución de los datos, las comparaciones entre tres o más grupos se hicieron mediante el test paramétrico de ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey, ó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn. Los índices de apoptosis y de células PCNA positivas fueron analizados de manera ciega al tratamiento por dos observadores independientes.

Los resultados se expresaron como media ± error estándar (S.E.M.). En todos los casos, la significancia estadística fue considerada cuando $p<0,05$.

RESULTADOS

Los resultados correspondientes a este trabajo de tesis fueron publicados parcialmente en:

- **"Caracterización del endometrio y del ambiente peritoneal de mujeres que padecen endometriosis. Estudios *in vivo* e *in vitro* de nuevas alternativas terapéuticas para esta enfermedad".** Meresman G, Bilotas M, Olivares C, **Ricci A**, Bastón JI, Barañao RI. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana (ABCL),* 45(4): 635-638, **2011.** ISSN: 1851-6114.

- **"Evaluación de nuevas posibles terapias para la endometriosis".** Meresman G, Bilotas M, Olivares C, **Ricci A**, Bastón JI, Barañao RI. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva (SAEGRE*), XVIII (1): 5-16, **2011**. ISSN: 1515-8845.

- **"Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis". Ricci AG**, Olivares CN, Bilotas MA, Meresman GF, Barañao RI. *Reproductive Sciences,* 18(7): 614-622, **2011**. ISSN: 1933-7191.

Parte de los resultados fueron recientemente enviados para su publicación a:

- **"Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis". Ricci AG**, Olivares CN, Bilotas MA, Bastón JI, Singla JJ, Meresman GF, Barañao RI. Enviado para su publicación a *American Journal of Clinical Nutrition,* **2012.**

Por otra parte, algunos resultados de esta tesis formaron parte del trabajo titulado "Evaluación de nuevas alternativas terapéuticas para la endometriosis", el cual fue premiado por la Academia Nacional de Medicina con el **Premio "Alberto Peralta Ramos"** en Diciembre del 2011.

NIVELES DE VEGF EN CULTIVOS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES

Es sabido que una de las principales fuentes de VEGF en el ambiente peritoneal son los macrófagos y que su producción podría estar afectada por los altos niveles de estrógenos observados en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis (75,175,176). Por otra parte, Bacci y col. demostraron recientemente que los macrófagos peritoneales son necesarios para el crecimiento y la vascularización de las lesiones en un modelo de endometriosis murino (177).

Por este motivo, nos propusimos conocer los niveles de VEGF producidos *in vitro* por los macrófagos peritoneales presentes en el modelo de endometriosis inducida en ratones BALB/c, utilizado en este trabajo.

En primer lugar, analizamos el número de células totales presentes en el líquido peritoneal de ratones con endometriosis inducida quirúrgicamente (EDT), y observamos que no presentan diferencias significativas respecto de ratones que no fueron sometidos a cirugía (Control) o sometidos a cirugía pero sin tejido en los puntos de sutura (SHAM) (Figura 1).

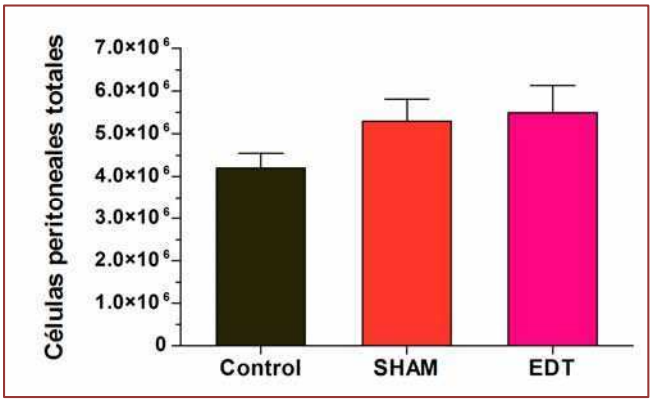


Figura 1. Células peritoneales totales en ratones con endometriosis (EDT), controles y/o SHAM. Se les indujo endometriosis quirúrgicamente a los animales y luego de un mes se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo el líquido peritoneal y se contaron las células en cámara de Neubauer. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de una vía. n= 8 (Control), n= 8 (SHAM), n= 8 (EDT).

Luego, a partir de cultivos de macrófagos peritoneales, corroboramos que la producción de VEGF es significativamente mayor en macrófagos provenientes de ratones con endometriosis respecto de la producida por macrófagos de animales sin endometriosis (Figura 2). La concentración de VEGF fue de 8,13 ± 2,17 pg/ml en los medios condicionados de macrófagos provenientes de animales controles, y de 19,16 ± 2,99 pg/ml en los medios condicionados de macrófagos provenientes de animales con endometriosis ($p<0.05$ vs. Control).

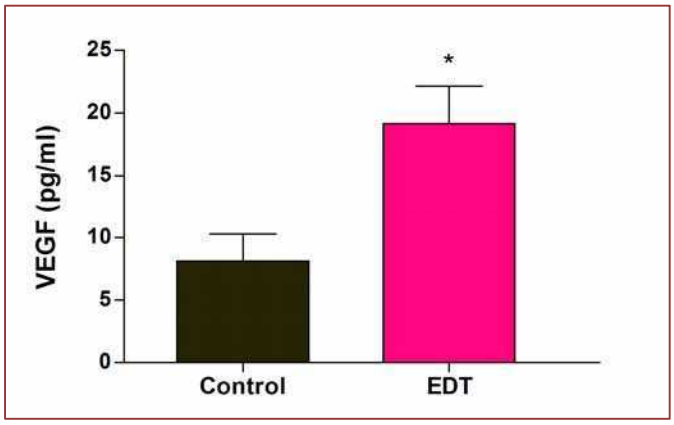


Figura 2. Niveles de VEGF presente en medios condicionados de macrófagos peritoneales de ratones con endometriosis y controles. Luego de un mes de inducida la endometriosis, se sacrificaron los animales y se sembraron 500.000 células peritoneales por pocillo de labtek de vidrio. Se incubaron 1 hora para permitir el pegado de los macrófagos y luego se lavaron los cultivos con PBS. Luego se incubaron durante 24 horas y se retiraron los medios condicionados para cuantificar los niveles de VEGF por ELISA. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de student. *p<0,05 vs. Control. n= 8 (Control), n= 8 (EDT).

TRATAMIENTOS ANTIANGIOGÉNICOS

EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-VEGF MURINO SOBRE EL DESARROLLO DE LA ENDOMETRIOSIS *IN VIVO*

LESIONES ENDOMETRIÓSICAS DESARROLLADAS

El tratamiento se inició a los 15 días de realizada la cirugía. Luego de dos semanas se sacrificaron los animales, se contaron las lesiones desarrolladas y se midieron sus volúmenes con la ayuda de un calibre.

Si bien esta terapéutica no modificó el número de lesiones por ratón es importante destacar que a los 15 días post-cirugía, las lesiones ya estarían establecidas y el tratamiento tendría que provocar su involución total para poder observar una diferencia en el número de lesiones halladas (178,179). La media del número de lesiones establecidas por animal en el grupo Control fue de 1,43 ± 0,2; mientras que en el grupo tratado con anti-VEGFm fue de 1,1 ± 0,31.

Asimismo, luego del tratamiento, tampoco obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en el volumen de las lesiones desarrolladas (Figura 3). Las lesiones del grupo Control presentaron un volumen promedio de 16,75 ± 6 mm^3, mientras que las lesiones del grupo Anti-VEGFm presentaron un volumen promedio de 9,17 ± 2,8 mm^3.

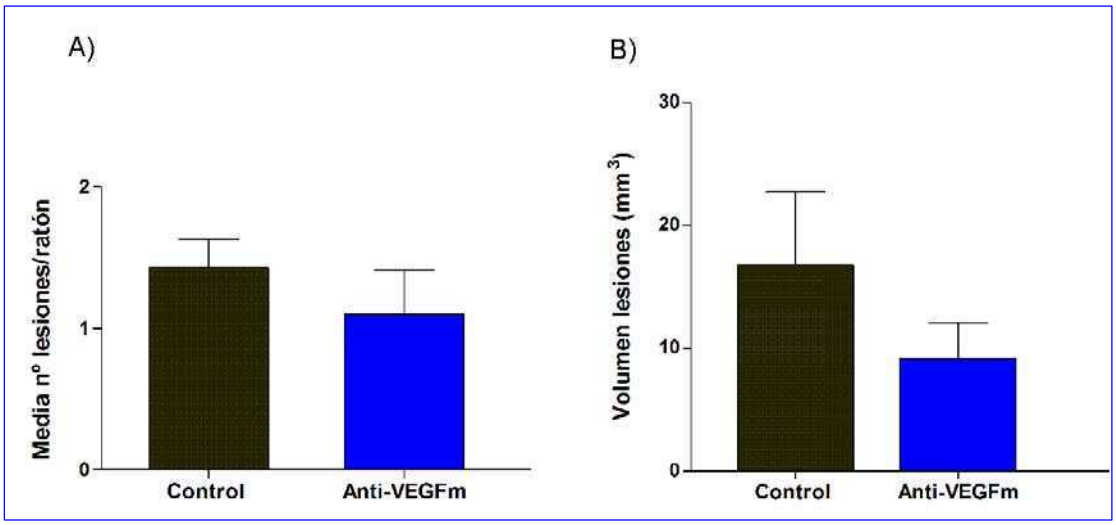


Figura 3. Efecto del tratamiento con Anti-VEGFm sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas. Los animales sometidos a la cirugía de inducción de endometriosis se trataron con dos aplicaciones (una por semana) de solución salina (Control), o de anticuerpo anti-VEGF murino (Anti-VEGFm), a partir del día 15 post-cirugía. Luego se sacrificaron y se midieron las lesiones con un calibre. **A)** El número de lesiones establecidas (> 0 mm^3) por ratón se calculó para cada grupo (media ± error estándar). Análisis estadístico: Test t de Student. n= 12 (Control), n= 12 (Anti-VEGFm). **B)** Los volúmenes de las lesiones desarrolladas por ratón se promediaron y se calculó la media ± error estándar de cada grupo. Análisis estadístico: Test t de Student con corrección de Welch. n= 10 (Control), n= 11 (Anti-VEGFm).

NIVELES PERITONEALES DE VEGF

Por último, analizamos los niveles de VEGF en el líquido peritoneal de los animales tratados con el anticuerpo policlonal murino y tampoco observamos diferencias significativas respecto de los controles (Figura 4). El grupo control presentó un valor promedio de 6,64 ± 0,84 pg/ml de VEGF en el líquido peritoneal, mientras que el grupo Anti-VEGFm presentó un valor promedio de 5,87 ± 0,75 pg/ml.

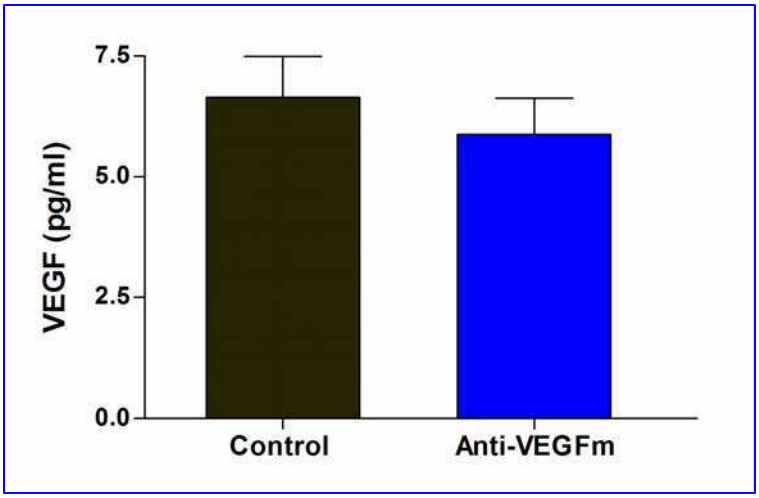


Figura 4. Efecto del tratamiento con Anti-VEGFm sobre los niveles de VEGF en el líquido peritoneal. Los niveles de VEGF se midieron con la técnica de ELISA. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student con corrección de Welch. n= 9 (Control), n= 12 (Anti-VEGFm).

EFECTO DEL BEVACIZUMAB SOBRE EL DESARROLLO DE LA ENDOMETRIOSIS *IN VIVO*

LESIONES ENDOMETRIÓSICAS DESARROLLADAS

El tratamiento con bevacizumab también se comenzó al día 15 post-cirugía. Pasadas las dos semanas de tratamiento, se contaron las lesiones desarrolladas y se midieron sus volúmenes con la ayuda de un calibre (Figura 5). Al igual que con el tratamiento anterior no observamos diferencias significativas en el número de lesiones desarrolladas (Figura 5A). La media del número de lesiones establecidas por animal en el grupo Control fue de 0,19 ± 0,07, mientras que en el grupo tratado con bevacizumab fue de 0,2 ± 0,06.

Sin embargo, la terapéutica con bevacizumab disminuyó significativamente el volumen de las lesiones en comparación con los controles (Figura 5B). Las lesiones del grupo Control presentaron un volumen promedio de 25,10 ± 6,19 mm^3, mientras que las lesiones del grupo Bevacizumab presentaron un volumen promedio de 10,55 ± 2,28 mm^3 ($p<0,05$ vs. Control).

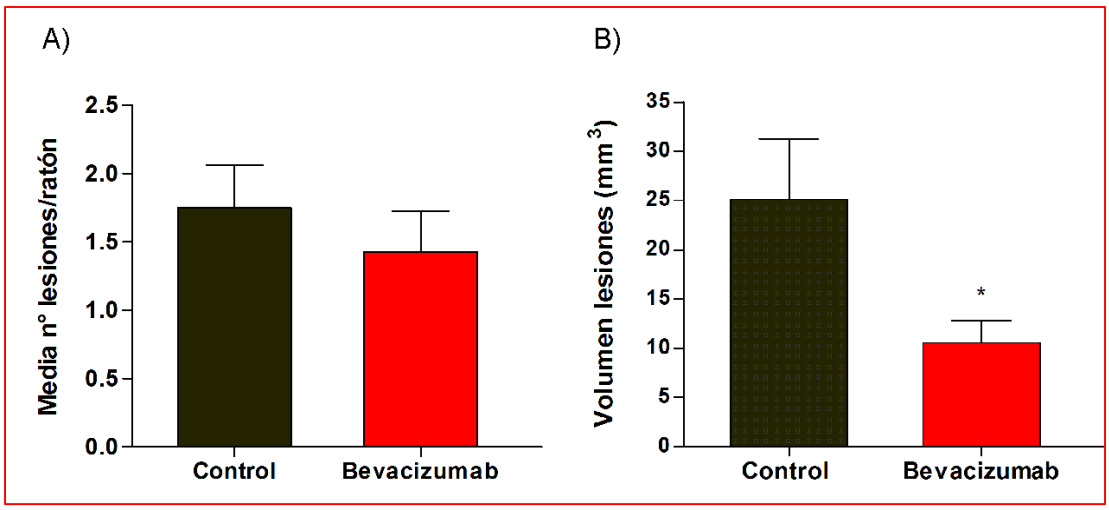


Figura 5. Efecto del tratamiento con bevacizumab sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas desarrolladas. Los animales sometidos a la cirugía de inducción de endometriosis se trataron con solución salina (Control) o con bevacizumab, cada 3 días a partir del día 15 post-cirugía y durante 2 semanas. **A)** El número de lesiones establecidas (> 0 mm^3) por ratón se calculó para cada grupo (media ± error estándar). Análisis estadístico: Test t de Student. n= 12 (Control), n= 12 (Bevacizumab). **B)** Los tamaños de las lesiones desarrolladas por ratón se promediaron y se calculó la media ± error estándar de cada grupo. Análisis estadístico: Test t de Student con corrección de Welch. *p<0,05 vs. Control. n= 11 (Control), n= 10 (Bevacizumab).

PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS

Luego de dos semanas de tratamiento con bevacizumab, los animales se sacrificaron y las lesiones endometriósicas fueron procesadas para realizar cortes histológicos.

La proliferación celular fue evaluada mediante inmunohistoquímica para PCNA. Observamos que el tratamiento con bevacizumab disminuyó significativamente la proliferación de las células epiteliales que conformaban las glándulas de las lesiones, en comparación con las del grupo Control (Figura 6A-B).

En el grupo Control se observó un 62,28 ± 7,16% de células positivas para PCNA, mientras que en el grupo tratado con bevacizumab se redujo a un 26,64 ± 5,16% (p<0,01 vs. Control)(Figura 6C).

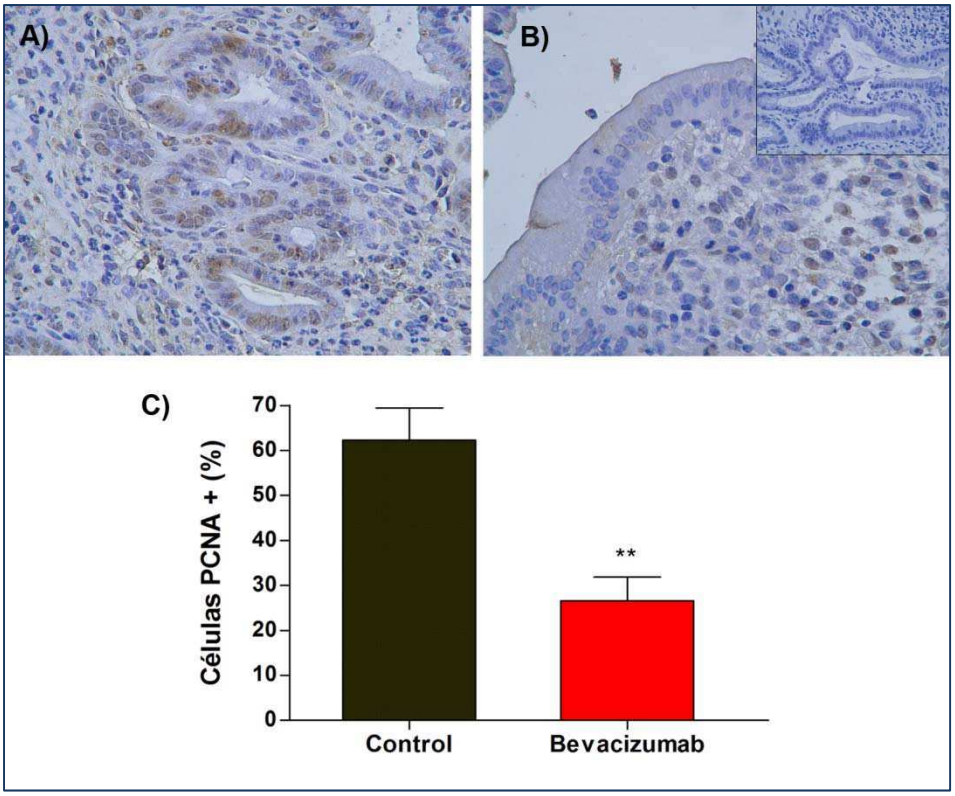


Figura 6. Efecto del tratamiento con bevacizumab sobre la expresión de PCNA en las células epiteliales que conforman las lesiones endometriósicas. La proliferación celular se evaluó por inmunohistoquímica para PCNA en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. El grupo Bevacizumab **(B)** presentó una reducción significativa del porcentaje de células PCNA positivas respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en B) se utilizó una inmunoglobulina de la misma clase y concentración que el primer anticuerpo utilizado. Aumento: 400X. La proliferación celular se cuantificó en la fracción epitelial como porcentaje de células positivas para PCNA **(C)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student. **p<0,01 vs. Control. n= 6 (Control), n= 5 (Bevacizumab).

La apoptosis se evaluó mediante la técnica de TUNEL. Complementariamente a los resultados observados en la proliferación celular, el tratamiento con bevacizumab aumentó el índice apoptótico de las células epiteliales (Figura 7A-B). El porcentaje de células apoptóticas fue de 2,19 ± 0,82 % en el grupo Control y de 12,14 ± 1,44% en el grupo Bevacizumab (p<0,001 vs. Control) (Figura 7C).

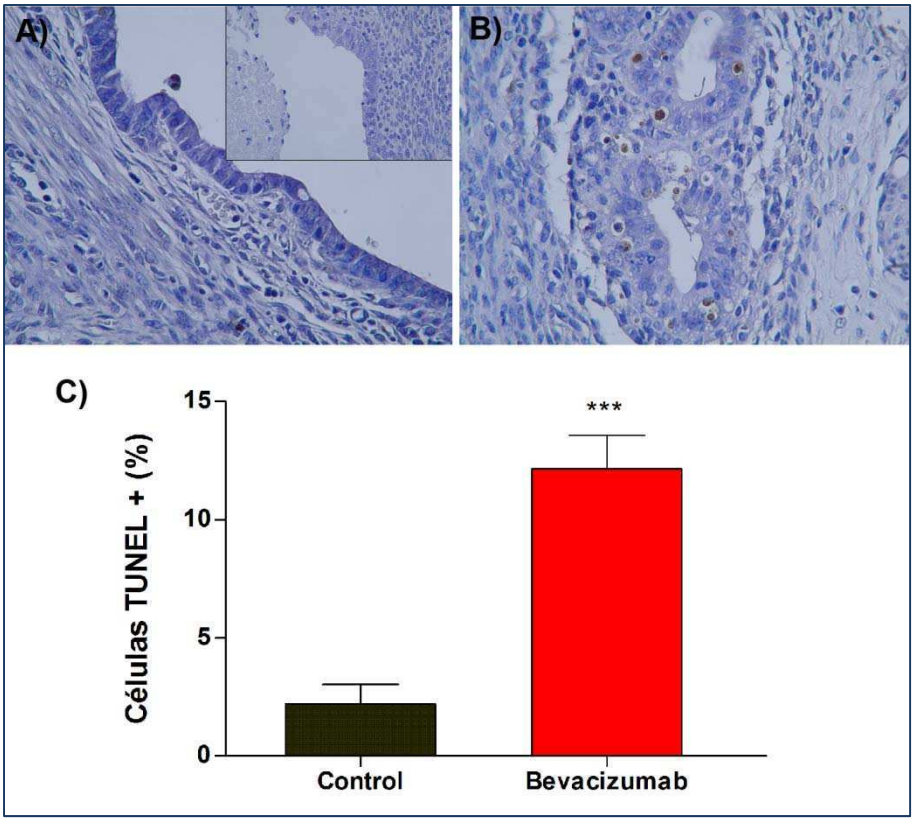


Figura 7. Efecto del tratamiento con bevacizumab sobre la apoptosis de las células epiteliales que conforman las lesiones endometriósicas. La apoptosis fue evaluada con la técnica de TUNEL en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. El grupo Bevacizumab **(B)** presentó un porcentaje de células apoptóticas significativamente mayor al grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en A) se evitó el agregado de la enzima TdT. Aumento: 400X. La apoptosis celular se cuantificó en la fracción epitelial como porcentaje de células TUNEL positivas **(C)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student. ***p<0,001 vs. Control. n= 6 (Control), n= 5 (Bevacizumab).

DENSIDAD VASCULAR DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS Y NIVELES DE VEGF PERITONEALES

Para determinar el efecto de la terapia antiangiogénica sobre la densidad vascular de las lesiones endometriósicas se cuantificó la inmunoreactividad para CD34 en los cortes histológicos mencionados previamente.

El porcentaje de área vascularizada fue 12,42 ± 1,02 % en el grupo Control y se redujo significativamente a 2,06 ± 0,44 % en el grupo tratado con bevacizumab (p<0,001 vs. Control) (Figura 8C).

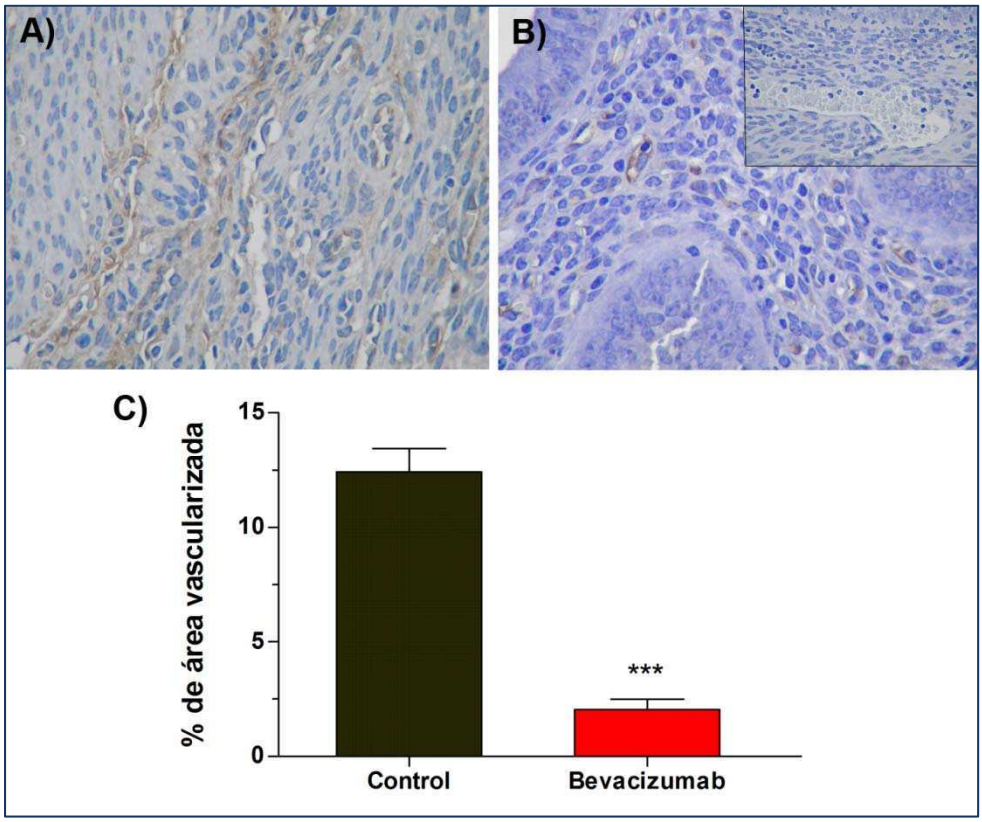


Figura 8. Efecto del tratamiento con bevacizumab sobre la densidad vascular de las lesiones endometriósicas. La densidad vascular se evaluó por inmunohistoquímica para CD34 en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. El grupo Bevacizumab **(B)** presentó una marcada reducción de la densidad vascular respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en B) se utilizó una inmunoglobulina de la misma clase y concentración que el primer anticuerpo utilizado. Aumento: 400X. La densidad vascular se cuantificó como porcentaje de área vascularizada **(C)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student. ***p<0,001 vs. Control. n= 6 (Control), n= 5 (Bevacizumab).

Por otra parte, analizamos los niveles de VEGF presentes en el líquido peritoneal de los animales y observamos que el tratamiento también produjo una reducción significativa en el grupo tratado con bevacizumab (Figura 9). En el grupo Control la concentración de VEGF fue 13,1 ± 3,8 pg/ml, y en el grupo tratado disminuyó a 2,6 ± 0,5 pg/ml (p<0,05 vs. Control).

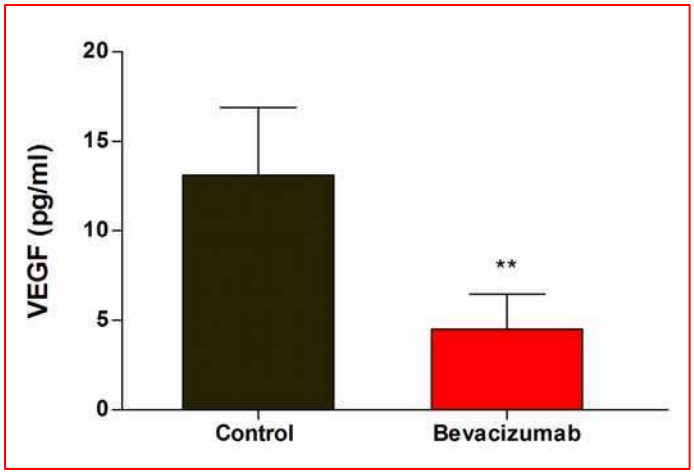


Figura 9. Efecto del tratamiento con bevacizumab sobre los niveles de VEGF en el líquido peritoneal. Los niveles de VEGF se midieron con la técnica de ELISA. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student.**p<0,01 vs. Control. n= 11 (Control), n= 9 (Bevacizumab).

Corroboramos entonces que el efecto inhibitorio obtenido con el tratamiento con bevacizumab, sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas, se encuentra claramente asociado a una disminución en los niveles de VEGF peritoneales y en consecuencia una menor vascularización de las lesiones endometriósicas.

TRATAMIENTOS NATURALES

EFECTO DEL RESVERATROL Y DEL EGCG SOBRE EL CICLO ESTRAL

Los animales sometidos a los tratamientos naturales con resveratrol y EGCG no presentaron diferencias en el ciclo estral respecto de los controles (Figura 10). Todos los animales ciclaron normalmente a lo largo del tratamiento. Durante el tratamiento con EGCG, el 100% del grupo control mostró un ciclado normal, y en los grupos tratados un 90% (EGCG I) y un 84% (EGCG II) cicló normalmente. Durante el tratamiento con resveratrol, el 80% del grupo control mostró un ciclado normal, mientras que en los grupos tratados el porcentaje fue de 90 (Res I y II).

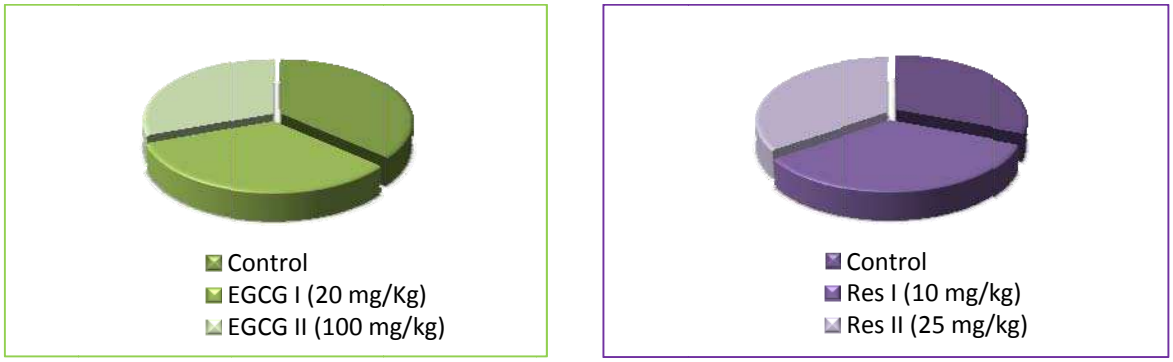


Figura 10. Efectos del resveratrol y del EGCG sobre el ciclo estral. Durante el mes de tratamiento con resveratrol y/o EGCG, los animales fueron ciclados para evaluar los efectos sobre el ciclo estral. En el gráfico se muestran los porcentajes de animales que ciclaron normalmente en cada grupo experimental. n= 8 (Control), n= 10 (Res I), n= 10 (Res II); n= 8 (Control), n= 9 (EGCG I), n= 6 (EGCG II).

EFECTO DEL EGCG SOBRE EL DESARROLLO DE LA ENDOMETRIOSIS *IN VIVO*

LESIONES ENDOMETRIÓSICAS DESARROLLADAS

El tratamiento con EGCG se inició a las dos semanas de realizada la cirugía. A los 30 días se contaron las lesiones y se midieron con la ayuda de un calibre. A pesar de que el tratamiento fue iniciado a los 15 días post-cirugía, ambas dosis fueron efectivas en reducir el número de lesiones encontradas. La media del número de lesiones establecidas por animal fue de 2,66 ± 0,33 para el grupo Control, 1,13 ± 0,23 para EGCG I y 1 ± 0,36 para EGCG II (Figura 11A).

Por otra parte, ambas dosis de EGCG fueron capaces de disminuir significativamente el volumen de las lesiones en comparación con los controles. El tamaño promedio de las lesiones en el grupo Control fue de 57,2 ± 13,98 mm^3, mientras que en el grupo tratado con la dosis I fue de 5,36 ± 1,7 mm^3 ($p<0,05$ vs. control) y en el grupo tratado con la dosis II de 2,42 ± 1,2 mm^3 ($p<0,01$ vs. control) (Figura 11B).

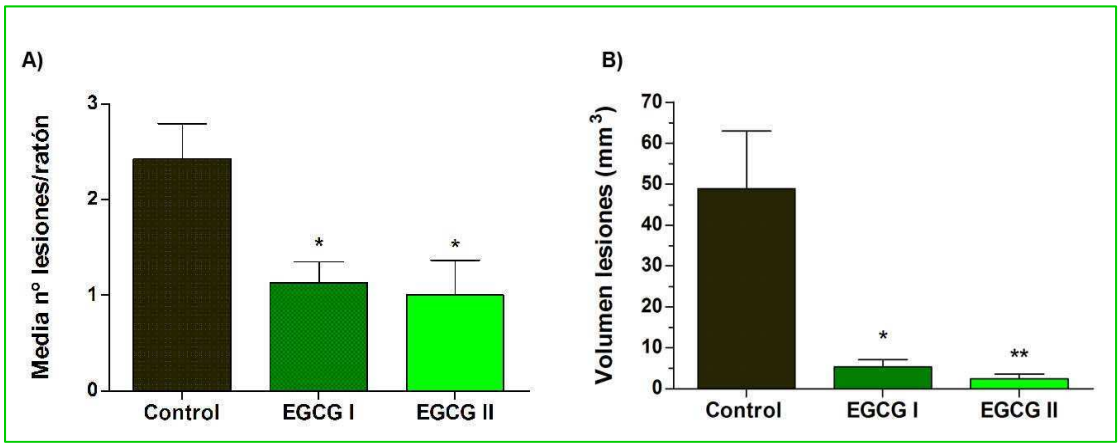


Figura 11. Efecto del tratamiento con EGCG sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas. Los animales sometidos a la cirugía de inducción de endometriosis se trataron diariamente con EGCG o agua (Control) a partir del día 15 post-cirugía durante 1 mes. **A)** El número de lesiones establecidas (> 0 mm^3) por ratón se calculó para cada grupo (media ± error estándar). Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. *p<0,05 vs. Control. **B)** Los tamaños de las lesiones desarrolladas por ratón se promediaron y se calculó la media ± error estándar de cada grupo. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. *p<0,05 / **p<0,01 vs. Control. n= 8 (Control), n= 9 (EGCG I), n= 6 (EGCG II).

PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS

Luego de 4 semanas de tratamiento con EGCG, los animales se sacrificaron y las lesiones endometriósicas fueron procesadas para realizar cortes histológicos.

La proliferación celular fue evaluada mediante inmunohistoquímica para PCNA. Observamos que el tratamiento con EGCG, en ambas dosis ensayadas, disminuyó significativamente la proliferación de las células epiteliales que conformaban las glándulas de las lesiones, en comparación con las del grupo Control (Figura 12A-C).

El porcentaje de células PCNA positivas fue de 72,53 ± 2,09 % en el grupo Control y se redujo a 44,6 ± 2,07 % luego del tratamiento con la dosis I (p<0,05 vs. Control), y a 24,9 ± 5,9 % con la dosis II (p<0,01 vs. Control) (Figura 20D).

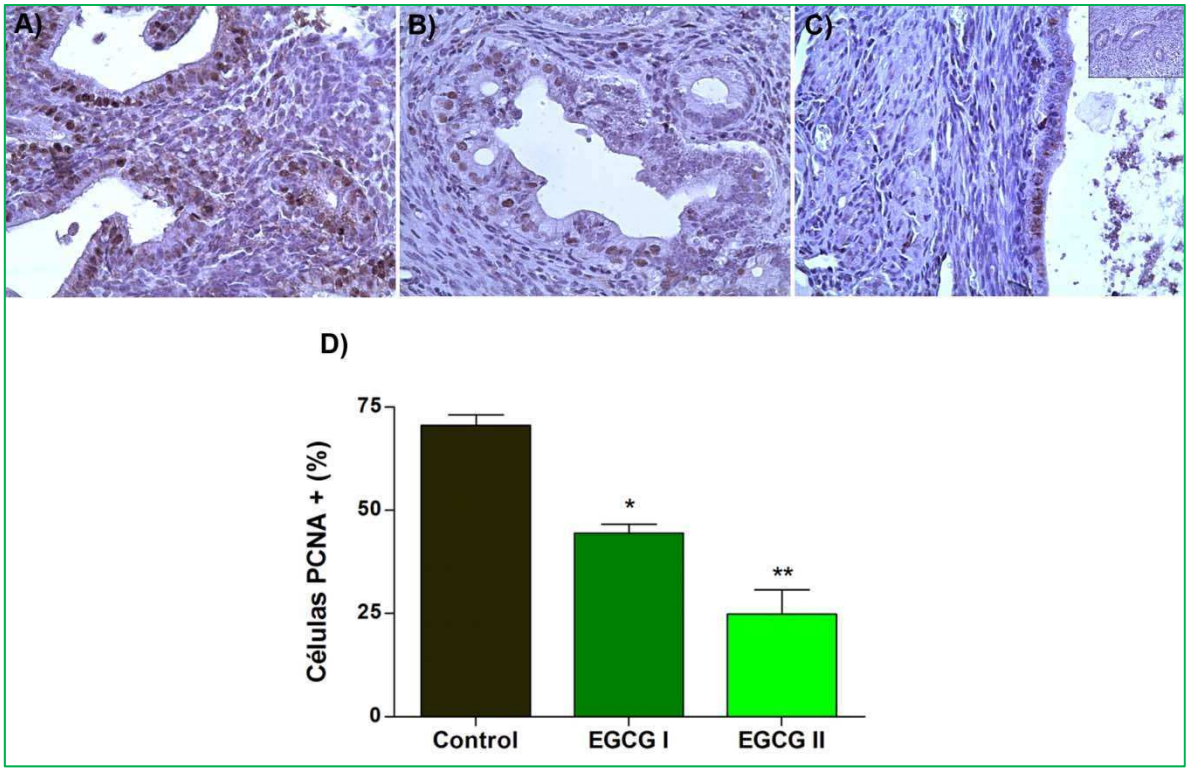


Figura 12. Efecto del tratamiento con EGCG sobre la expresión de PCNA en las células epiteliales que conforman las lesiones endometriósicas. La proliferación celular se evaluó por inmunohistoquímica para PCNA en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. Los grupos tratados con EGCG I **(B)** y EGCG II **(C)** presentan una reducción significativa del porcentaje de células positivas para PCNA respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en C) se utilizó una inmunoglobulina de la misma clase y concentración que el primer anticuerpo utilizado. Aumento: 400X. La proliferación celular se cuantificó en la fracción epitelial como porcentaje de células PCNA positivas **(D)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. *p<0,05 / **p<0,01 vs. Control. n= 6 (Control), n= 6 (EGCG I), n= 5 (EGCG II)

La apoptosis se evaluó mediante la técnica de TUNEL. Complementariamente a los resultados observados en la proliferación celular, el tratamiento con EGCG aumentó el índice apoptótico de las células epiteliales (Figura 13A-C). El porcentaje de células TUNEL positivas fue de 0,73 ± 0,2% en el grupo Control, de 4,2 ± 1,02% en el grupo EGCG I (p<0,05 vs. Control), y de 5,2 ± 0,96 % en el grupo EGCG II (p<0,01 vs. control) (Figura 13D).

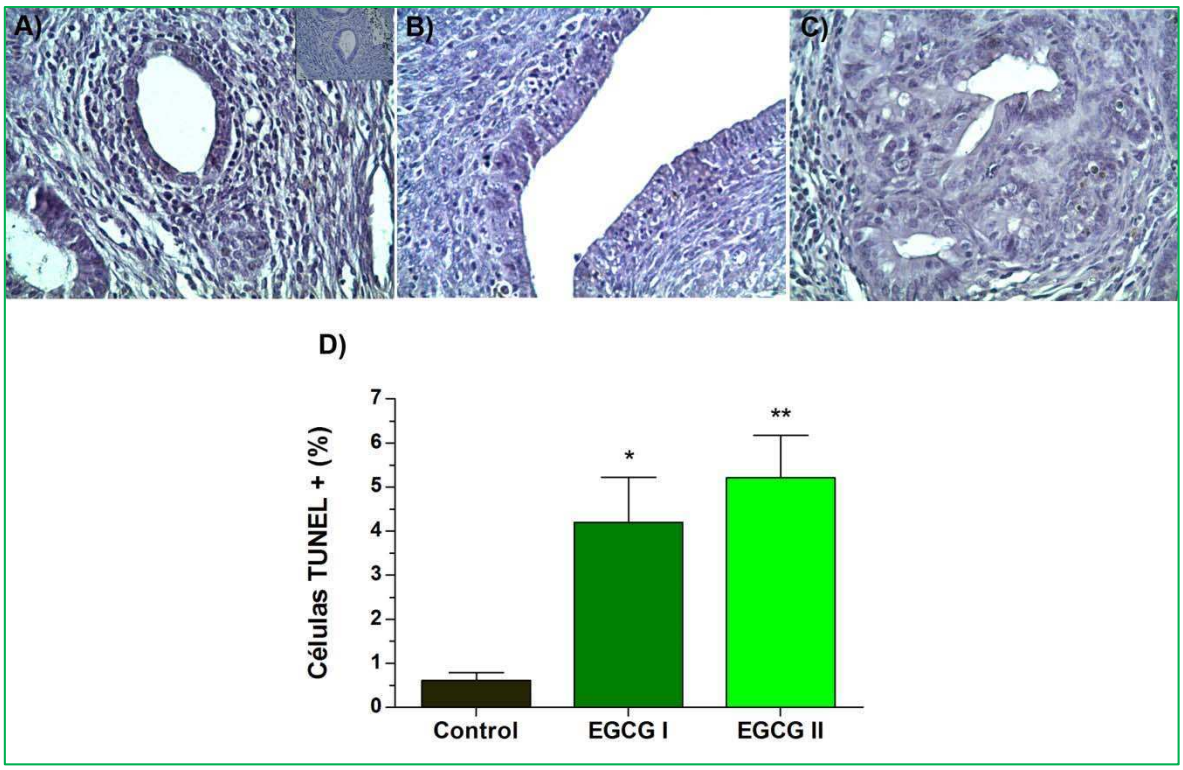


Figura 13. Efecto del tratamiento con EGCG sobre la apoptosis de las células epiteliales que conforman las lesiones endometriósicas. La apoptosis se evaluó con la técnica de TUNEL en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. Los grupos tratados con EGCG I **(B)** y EGCG II **(C)** presentan un incremento significativo del porcentaje de células apoptóticas respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en A) se evitó el agregado de la enzima TdT. Aumento: 400X. La apoptosis celular se cuantificó en la fracción epitelial como porcentaje de células TUNEL positivas **(D)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. *p<0,05 / **p<0,01 vs. Control. n= 6 (Control), n= 6 (EGCG I), n= 5 (EGCG II)

DENSIDAD VASCULAR DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS Y NIVELES DE VEGF PERITONEALES

Para evaluar el efecto de la terapia con EGCG sobre la angiogénesis, se analizó la densidad vascular de las lesiones endometriósicas y los niveles de VEGF en el líquido peritoneal de los animales.

El área vascularizada dentro de la lesión se cuantificó midiendo la inmunoreactividad para CD34 en los cortes histológicos mencionados previamente, y observamos que el tratamiento con EGCG disminuyó significativamente las vascularización de las lesiones endometriósicas (Figura 14A-C). El porcentaje de área vascularizada fue de 11,04 ± 0,83% en el grupo Control, y se redujo a

3,08 ± 0,72% en el grupo tratado con la dosis I (p<0,001 vs. Control) y a 2,62 ± 0,38% con la dosis II (p< 0,001 vs. Control) (Figura 14D).

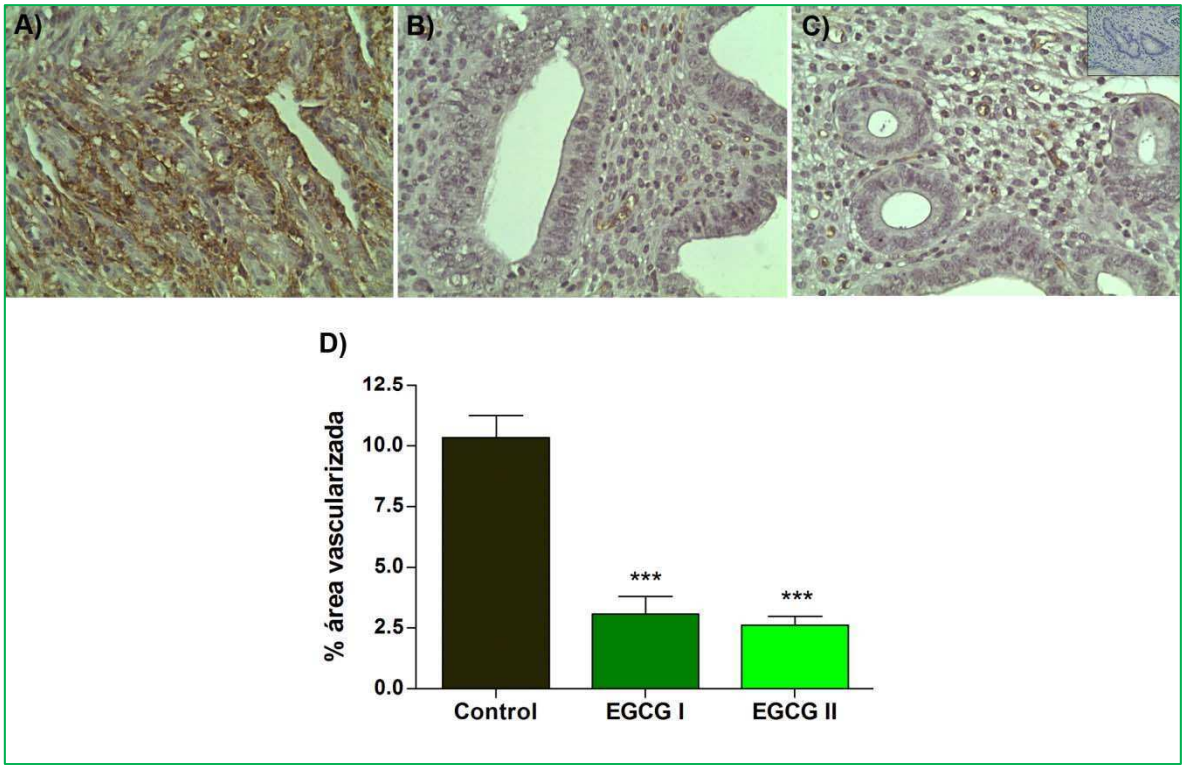


Figura 14. Efecto del tratamiento con EGCG sobre la densidad vascular de las lesiones endometriósicas. La densidad vascular se evaluó por inmunohistoquímica para CD34 en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. Los grupos tratados con EGCG I **(B)** y EGCG II **(C)** presentan una reducción significativa de la densidad vascular respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en C) se utilizó una inmunoglobulina de la misma clase y concentración que el primer anticuerpo utilizado. Aumento: 400X. La densidad vascular se cuantificó como porcentaje de área vascularizada **(D)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. ***p<0,001 vs. Control. n= 5 (Control), n= 6 (EGCG I), n= 5 (EGCG II)

Por otra parte, observamos que este tratamiento también redujo significativamente los niveles de VEGF presentes en el líquido peritoneal, ya sea con la dosis más alta (II) así como con la dosis más baja (I). En el grupo Control la concentración de VEGF fue de 26,9 ± 4 pg/ml, en el grupo tratado con la dosis I disminuyó a 2,86 ± 1,04 pg/ml (p<0,001 vs. Control), y en el grupo tratado con la dosis II disminuyó a 11,77 ± 3,95 pg/ml (p<0,05 vs. Control) (Figura 15).

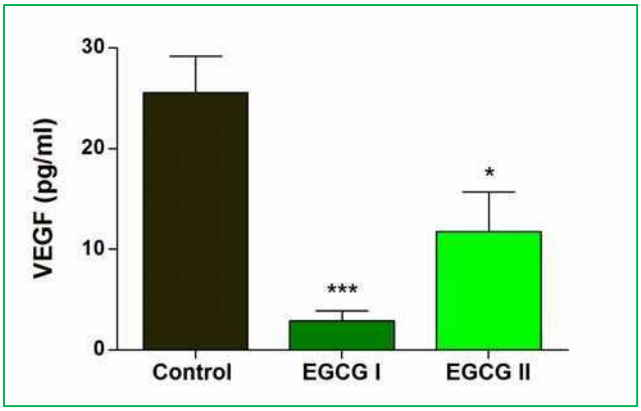


Figura 15. Efecto del tratamiento con EGCG sobre los niveles de VEGF en el líquido peritoneal. Los niveles de VEGF se midieron con la técnica de ELISA. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. *p<0,05 / ***p<0,001 vs. Control. n= 8 (Control), n= 7 (EGCG I), n= 6 (EGCG II).

Dedujimos entonces que el EGCG posee actividad antiangiogénica y al menos parte del efecto inhibitorio observado sobre el desarrollo de la endometriosis con este compuesto natural en el modelo murino podría deberse a un efecto inhibitorio sobre la vascularización de las lesiones.

EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL DESARROLLO DE LA ENDOMETRIOSIS *IN VIVO*

LESIONES ENDOMETRIÓSICAS DESARROLLADAS

El tratamiento con resveratrol se inició a las dos semanas de realizada la cirugía. A los 30 días se contaron las lesiones y se midieron con la ayuda de un calibre. Al igual que lo observado con el EGCG, a pesar de que el tratamiento fue iniciado al día 15 post-cirugía, la dosis más alta administrada fue efectiva en reducir el número de lesiones encontradas. La media del número de lesiones por animal fue de 2,43 ± 0,37 para el grupo Control, de 2,67 ± 0,17 para Res I y de 1,22 ± 0,22 para Res II (p<0,05 vs. Control) (Figura 16A).

Por otra parte, el tratamiento disminuyó significativamente el volumen de la lesiones en la dosis más alta ensayada en comparación con los controles. El tamaño promedio de las lesiones en el grupo Control fue de 48,83 ± 14,15 mm^3, en el grupo tratado con la dosis I fue de 40,59 ± 1,7 mm^3 y en el grupo tratado con la dosis II se redujo a 8,17 ± 2,43 mm^3 ($p<0,05$ vs. control) (Figura 16B).

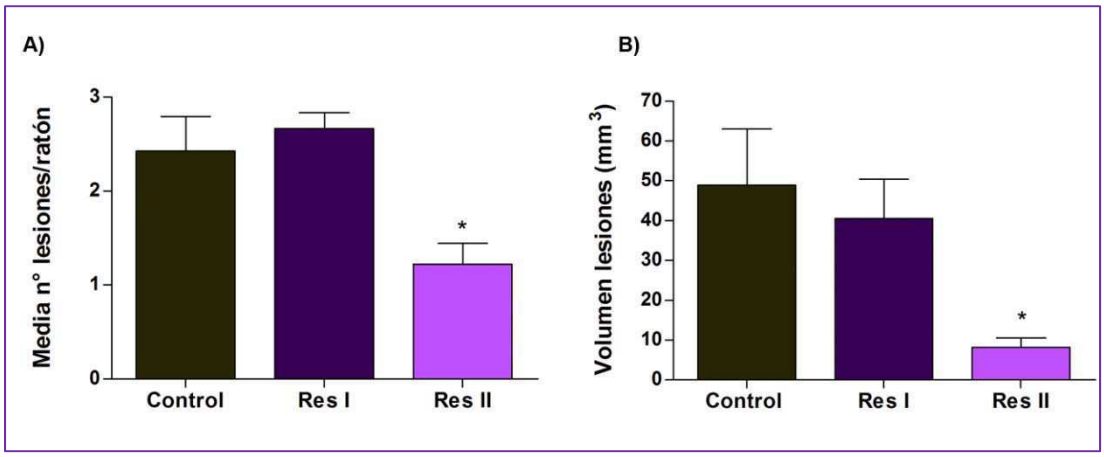


Figura 16. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas. Los animales sometidos a la cirugía de inducción de endometriosis se trataron diariamente con resveratrol o vehículo (Control) a partir del día 15 post-cirugía durante 1 mes. **A)** El número de lesiones establecidas (> 0 mm^3) por ratón se calculó para cada grupo (media ± error estándar). **B)** Los tamaños de las lesiones desarrolladas por ratón se promediaron y se calculó la media ± error estándar de cada grupo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. *$p<0,05$ vs. Control. n= 8 (Control), n= 10 (Res I), n= 10 (Res II).

PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS

Luego de 4 semanas de tratamiento con EGCG, los animales se sacrificaron y las lesiones endometriósicas fueron procesadas para realizar cortes histológicos.

La proliferación celular fue evaluada mediante inmunohistoquímica para PCNA. Observamos que el tratamiento con resveratrol, en ambas dosis ensayadas, disminuyó significativamente la proliferación de las células epiteliales que conformaban las glándulas de las lesiones, en comparación con las del grupo Control (Figura 17A-C).

El porcentaje de células PCNA positivas fue de 70,6 ± 2,6 % en el grupo Control y se redujo a 46,1 ± 5,9 % luego del tratamiento con la dosis I ($p<0,01$ vs. Control), y a 28,2 ± 5,6 % luego del tratamiento con la dosis II ($p<0,001$ vs. Control) (Figura 17D).

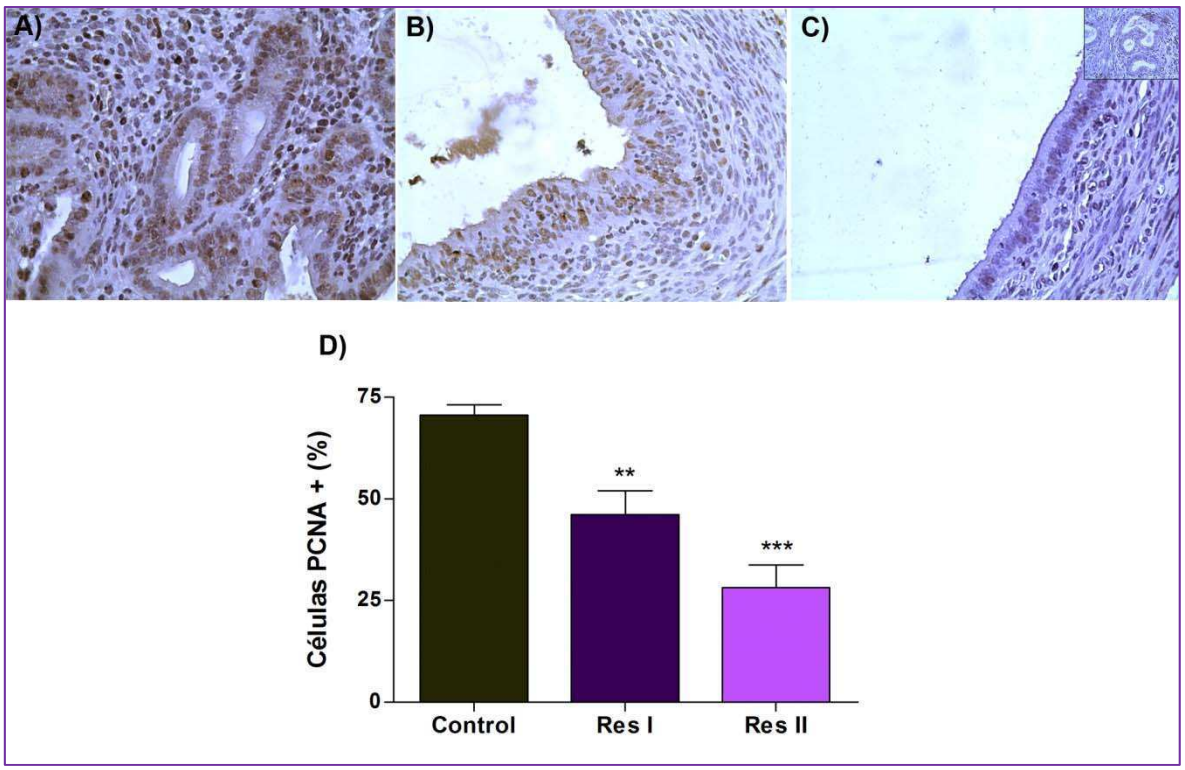


Figura 17. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre la expresión de PCNA en las células epiteliales que conforman las lesiones endometriósicas. La proliferación celular se evaluó por inmunohistoquímica para PCNA en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. Los grupos tratados con Res I **(B)** y Res II **(C)** presentan una reducción significativa del porcentaje de células positivas para PCNA respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en C) se utilizó una inmunoglobulina de la misma clase y concentración que el primer anticuerpo utilizado. Aumento: 400X. La proliferación celular se cuantificó en la fracción epitelial como porcentaje de células PCNA positivas **(D)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguida del test de Tukey. **p<0,01 / ***p<0,001 vs. Control. n= 6 (Control), n= 6 (Res I), n= 5 (Res II)

La apoptosis se evaluó mediante la técnica de TUNEL. Complementariamente a los resultados observados en la proliferación celular, el tratamiento con resveratrol también aumentó el índice apoptótico de las células epiteliales (Figura 18A-C). El porcentaje de células TUNEL positivas fue de 0,6 ± 0,2% en el grupo Control, de 4,22 ± 0,8% en el grupo Res I (p<0,01 vs. Control), y de 6,05 ± 1,3% en el grupo Res II (p<0,001 vs. control) (Figura 18D).

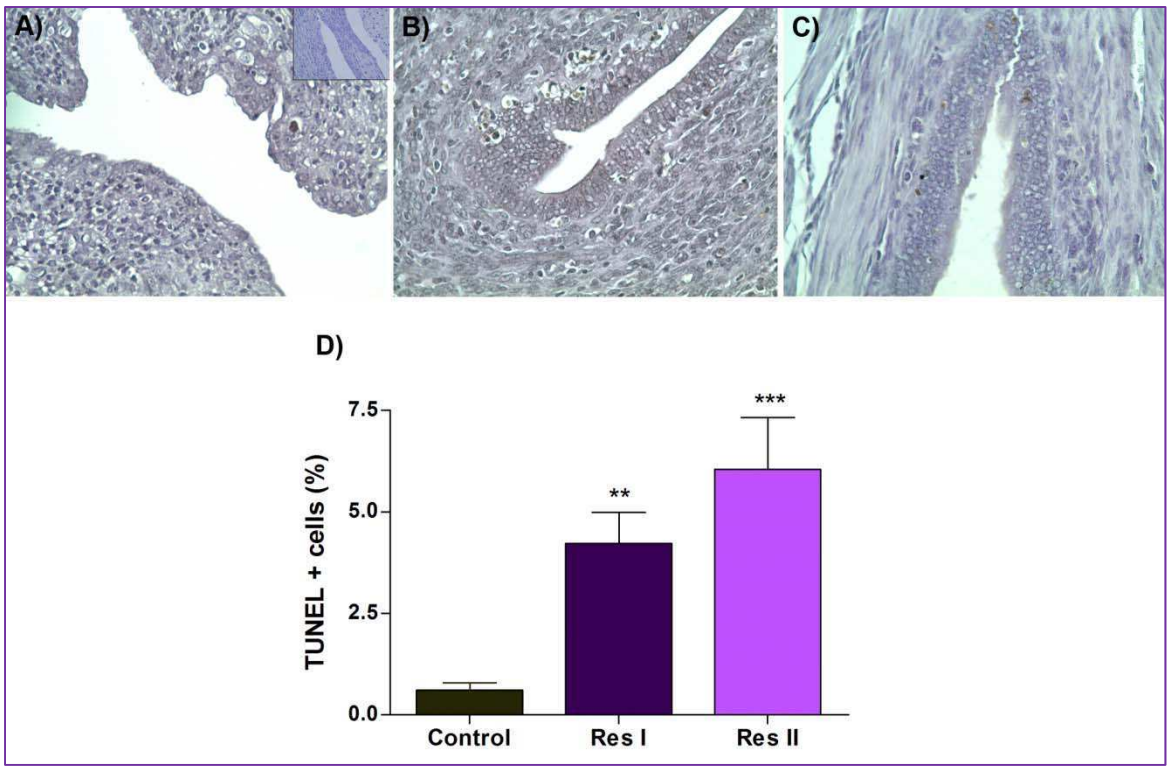


Figura 13. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre la apoptosis de las células epiteliales que conforman las lesiones endometriósicas. La apoptosis se evaluó con la técnica de TUNEL en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. Los grupos tratados con Res I **(B)** y Res II **(C)** presentan un incremento significativo del porcentaje de células apoptóticas respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en A) se evitó el agregado de la enzima TdT. Aumento: 400X. La apoptosis celular se cuantificó en la fracción epitelial como porcentaje de células TUNEL positivas **(D)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. *p<0,01 / ***p<0,001 vs. Control. n= 6 (Control), n= 6 (EGCG I), n= 5 (EGCG II).

DENSIDAD VASCULAR DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓSICAS Y NIVELES DE VEGF PERITONEALES

Al igual que en el tratamiento con EGCG, se evaluó el efecto de la terapia con resveratrol sobre la angiogénesis, analizando nuevamente la densidad vascular de las lesiones endometriósicas y los niveles de VEGF peritoneales.

El área vascularizada dentro de la lesión se cuantificó midiendo la inmunoreactividad para CD34 en los cortes histológicos mencionados previamente, y observamos que el resveratrol disminuyó significativamente las vascularización de las lesiones endometriósicas con ambas dosis ensayadas (Figura 19A-C). El porcentaje de área vascularizada fue de 10,34 ± 0,91% en el grupo

Control, y se redujo a 2,8 ± 0,63% en el grupo tratado con la dosis I (p<0,01 vs. Control) y a 2,65 ± 0,61% en el grupo tratado con la dosis II (p< 0,01 vs. Control) (Figura 19D).

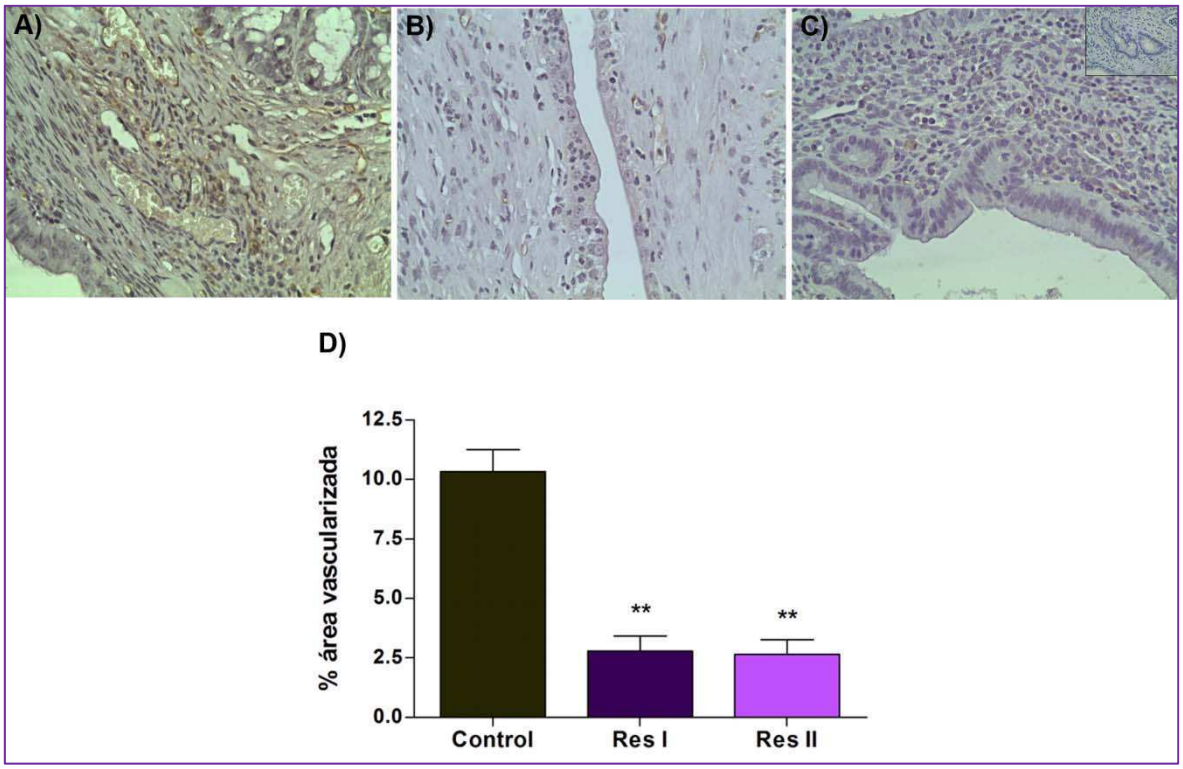


Figura 19. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre la densidad vascular de las lesiones endometriósicas. La densidad vascular se evaluó por inmunohistoquímica para CD34 en cortes histológicos de las lesiones endometriósicas inducidas. Los grupos tratados con Res I **(B)** y Res II **(C)** presentan una reducción significativa de la densidad vascular respecto del grupo Control **(A)**. En el control negativo (recuadro en C) se utilizó una inmunoglobulina de la misma clase y concentración que el primer anticuerpo utilizado. Aumento: 400X. La densidad vascular se cuantificó como porcentaje de área vascularizada **(D)**. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. **p<0,01 vs. Control. n= 5 (Control), n= 6 (Res I), n= 6 (Res II)

Observamos que el tratamiento con resveratrol muestra una tendencia dosis dependiente a reducir los niveles de VEGF presentes en el líquido peritoneal (Control: 25,5 ± 3,7 pg/ml > Res I: 23,3 ± 3,3 pg/ml > Res II: 16,5 ± 2,4 pg/ml). Sin embargo esa tendencia no resultó ser estadísticamente significativa (Figura 20).

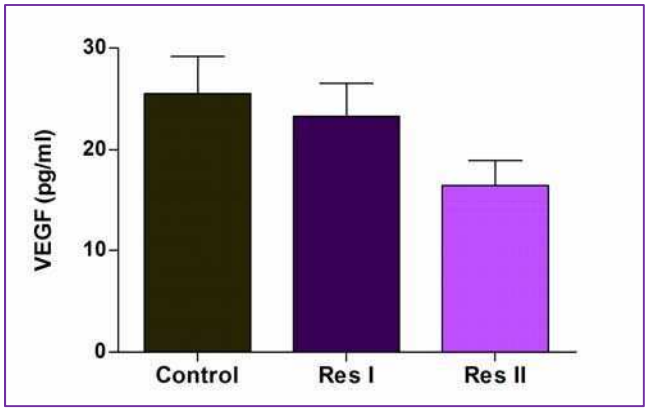


Figura 20. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre los niveles de VEGF en el líquido peritoneal. Los niveles de VEGF se midieron con la técnica de ELISA. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de una vía seguido. n= 8 (Control), n= 10 (Res I), n= 9 (Res II).

Podemos concluir que el resveratrol posee un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la endometriosis, a través de una disminución de la proliferación y la densidad vascular en las lesiones endometriósicas, así como también a través de un aumento de la apoptosis.

EFECTO DEL RESVERATROL Y DEL EGCG SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES HUMANAS

Para tener una perspectiva más completa del efecto de estos compuestos sobre el desarrollo de la endometriosis, decidimos estudiar el efecto directo que ejercen *in vitro* sobre la proliferación y la apoptosis de células epiteliales endometriales (CEE) humanas. Para ello, se realizaron cultivos primarios de CEE partiendo de biopsias de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis y mujeres controles.

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES HUMANAS

Nuestros resultados demuestran que tanto el EGCG como el resveratrol inhiben la proliferación de estas células de manera dosis dependiente.

A concentraciones de 40 µM, 80 µM y 100 µM de EGCG, el porcentaje de proliferación celular disminuyó a un 21,41 ± 13,51% ($p<0,01$ vs. Basal), 12,49 ± 7,6% ($p<0,01$ vs. Basal) y 16,47 ± 6,8% ($p<0,01$ vs. Basal) respectivamente para los cultivos provenientes de mujeres controles (Figura 21 Ai); y a un 25,81 ± 5,14% ($p<0,05$ vs. Basal), 18,07 ± 5,68% ($p<0,01$ vs. Basal) y 11,96 ± 4,83% ($p<0,001$ vs. Basal) respectivamente, para los cultivos provenientes de pacientes con endometriosis (Figura 21 Bi).

El estímulo con resveratrol mostró a concentraciones de 50 µM y 100 µM una proliferación celular reducida de 69,15 ± 10,58% ($p<0,05$ vs. Basal) y 60,16 ± 5,99% ($p<0,01$ vs. Basal) respectivamente para los cultivos provenientes de mujeres controles (Figura 21 Aii); y de 73,95 ± 8,57 ($p<0,05$ vs. Basal) y 68,35 ± 6,5% ($p<0,01$ vs. Basal) respectivamente para los cultivos provenientes de pacientes con endometriosis (Figura 21 Bii).

Coincidentemente con los resultados obtenidos en trabajos previos de nuestro laboratorio (180), no se observaron diferencias en el efecto ejercido por los compuestos sobre la proliferación de las células respecto del diagnóstico de las biopsias.

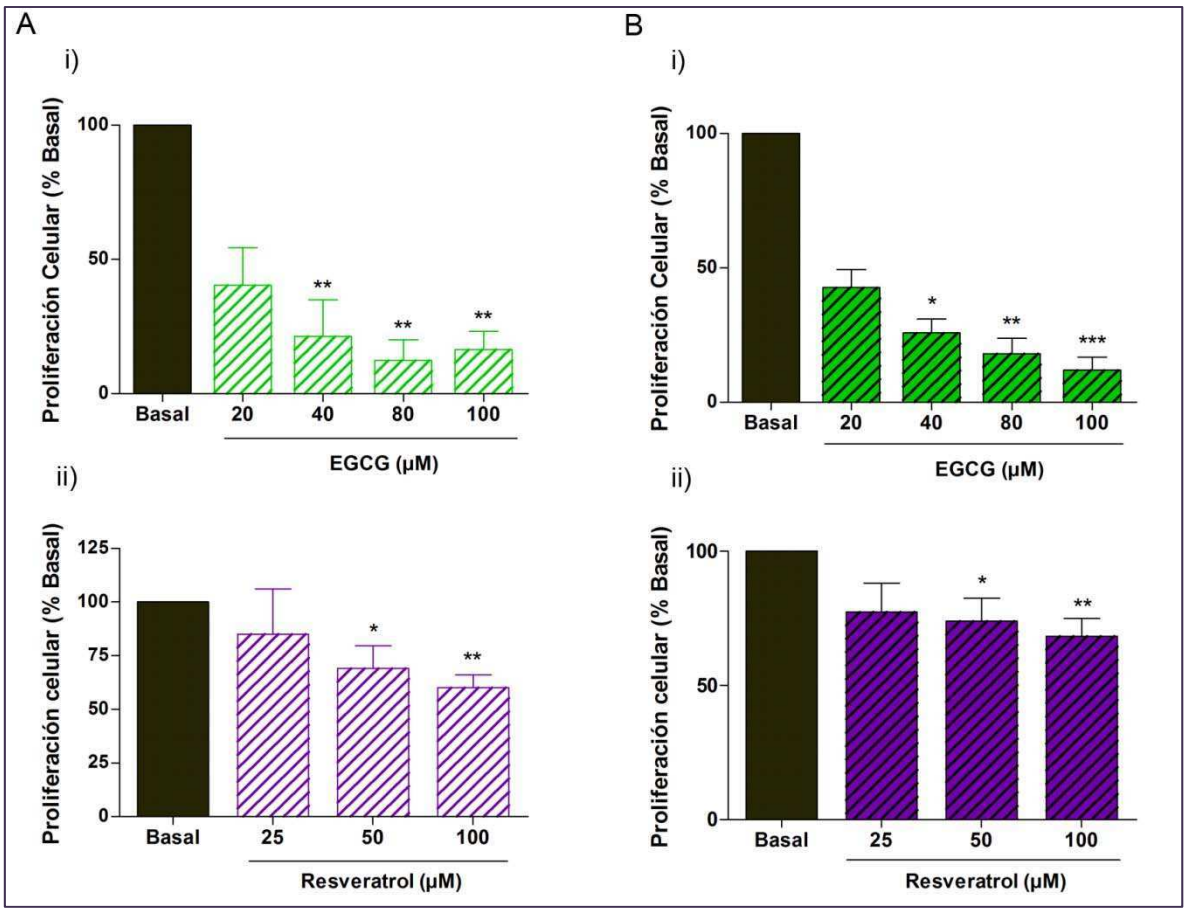


Figura 21. Efecto del resveratrol y del EGCG sobre la proliferación celular en cultivos primarios de CEE. Se realizaron cultivos primarios de CEE provenientes de biopsias de endometrio de 14 mujeres control **(A)** y 16 pacientes con endometriosis **(B)**. Luego de 24 h de estímulo con distintas dosis de EGCG **(i)** o resveratrol **(ii)**, se evaluaron los índices de proliferación celular utilizando el kit de reducción de MTS. La proliferación celular fue expresada como porcentaje del basal (sin tratamiento) para cada cultivo. Los resultados muestran la media ± error estándar de todos los cultivos para cada condición. Cada condición experimental se ensayó por sextuplicado. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. *p<0,05 / **p<0,01 / ***p<0,01 vs. Basal.

APOPTOSIS DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES HUMANAS

Complementariamente a los resultados observados en la proliferación celular, ambos tratamientos fueron capaces de aumentar los niveles de apoptosis de las CEE.

A concentraciones de 40 µM, 80 µM y 100 µM de EGCG, el porcentaje de células TUNEL positivas se incrementó a un 26,53 ± 7,87% (p<0,05 vs. 0 µM), 22,19 ± 4,41% (p<0,05 vs. 0 µM) y 33 ± 6,14% (p<0,01 vs. 0 µM) respectivamente para los cultivos provenientes de mujeres controles (Figura 22 Ai); y a un 25,58 ± 8,39% (p<0,01 vs. 0 µM), 16,87 ± 3,65% (p<0,01 vs. 0 µM) y 24,04 ±

4,85% (p<0,01 vs. 0 µM) respectivamente, para los cultivos provenientes de pacientes con endometriosis (Figura 22 Bi). La apoptosis basal (0 µM) fue de 1,89 ± 0,33% para los cultivos controles y de 0,95 ± 0,45% para los cultivos de pacientes con endometriosis.

El estímulo con resveratrol mostró a concentraciones de 50 µM y 100 µM una apoptosis celular de 20,65 ± 10,60% (p<0,05 vs. 0 µM) y 26,20 ± 15,07% (p<0,01 vs. 0 µM) respectivamente para los cultivos provenientes de mujeres controles (Figura 22 Aii). En pacientes con endometriosis, la apoptosis celular mostró un incremento estadísticamente significativo únicamente con la concentración de 100 µM: 16,51 ± 7,24% (p<0,01 vs. 0 µM) (Figura 22 Bii). La apoptosis basal (0 µM) fue de 2,09 ± 0,09% para los cultivos controles y de 1,24 ± 0,50 para los cultivos de pacientes con endometriosis.

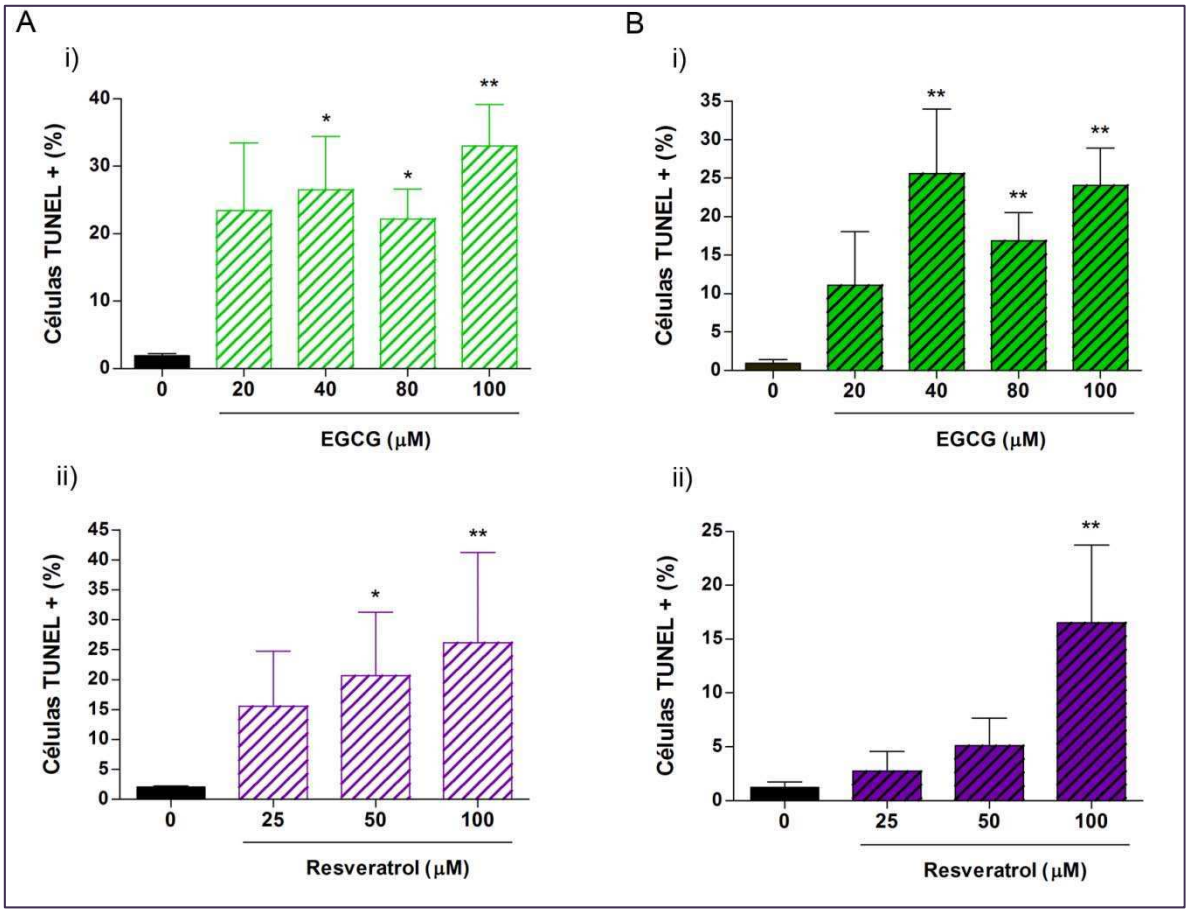


Figura 22. Efecto del resveratrol y del EGCG sobre la apoptosis en cultivos primarios de CEE. Se realizaron cultivos primarios de CEE provenientes de biopsias de endometrio de 8 mujeres control **(A)** y 7 pacientes con endometriosis **(B)**. Luego de 24 h de estímulo con distintas dosis de EGCG **(i)** o resveratrol **(ii)**, se evaluaron los índices de apoptosis utilizando un kit de TUNEL con fluoresceína. Se realizó una marcación nuclear con DAPI y se contaron 300 células totales para cada condición experimental por cultivo. La apoptosis fue expresada como porcentaje de células TUNEL positivas. Los resultados muestran la media ± error estándar

de todos los cultivos para cada condición. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. *p<0,05 / **p<0,01 vs. 0 µM.

Nuevamente, al igual que en la proliferación celular, los efectos de los compuestos sobre la apoptosis de las CEE resultaron ser independientes del diagnóstico de las biopsias. Estos resultados son acordes con observaciones previas de nuestro laboratorio (170,180).

En la figura 23 se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos sobre la apoptosis de las CEE en los cultivos primarios.

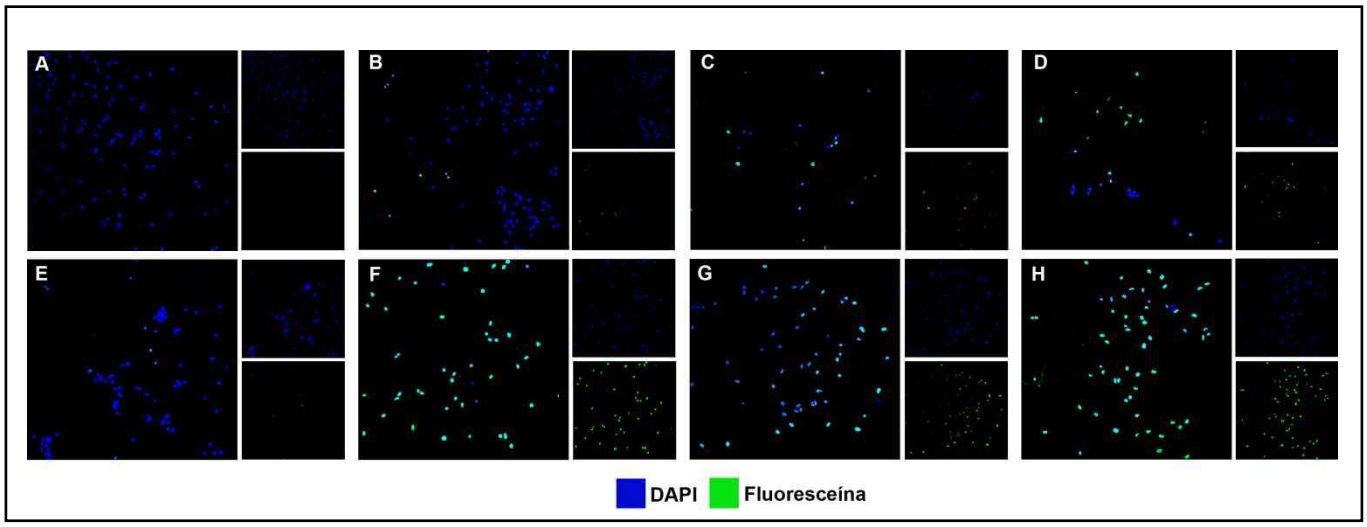


Figura 23. TUNEL en cultivos primarios de CEE. Fotografías representativas de los efectos del resveratrol y del EGCG sobre la apoptosis de CEE. Para cada condición se muestra la co-localización de marcas en la imagen principal y a su derecha las imágenes correspondientes a los núcleos marcados con DAPI (imagen superior) o fluoresceína (imagen inferior). **A)** Control. **B)** Resveratrol 25 µM. **C)** Resveratrol 50 µM. **D)** Resveratrol 100 µM. **E)** EGCG 20 µM. **F)** EGCG 40 µM. **G)** EGCG 80 µM. **H)** EGCG 100 µM. Aumento: 20X.

Podemos concluir que los tratamientos naturales con EGCG y resveratrol poseen un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de las células epiteliales endometriales humanas *in vitro*.

MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES ENDOMETRIALES HUMANAS

Previo a los estudios referidos al efecto del resveratrol sobre la migración de las células endoteliales endometriales humanas (HEEC), nos propusimos conocer las características migratorias inherentes a la línea celular, dado que algunas líneas endoteliales requieren la presencia de un estímulo para migrar. Para ello analizamos la migración basal y la migración estimulada con distintos factores de crecimiento, y observamos que en presencia de los mismos la migración aumentaba considerablemente respecto de la migración basal (Figura 24).

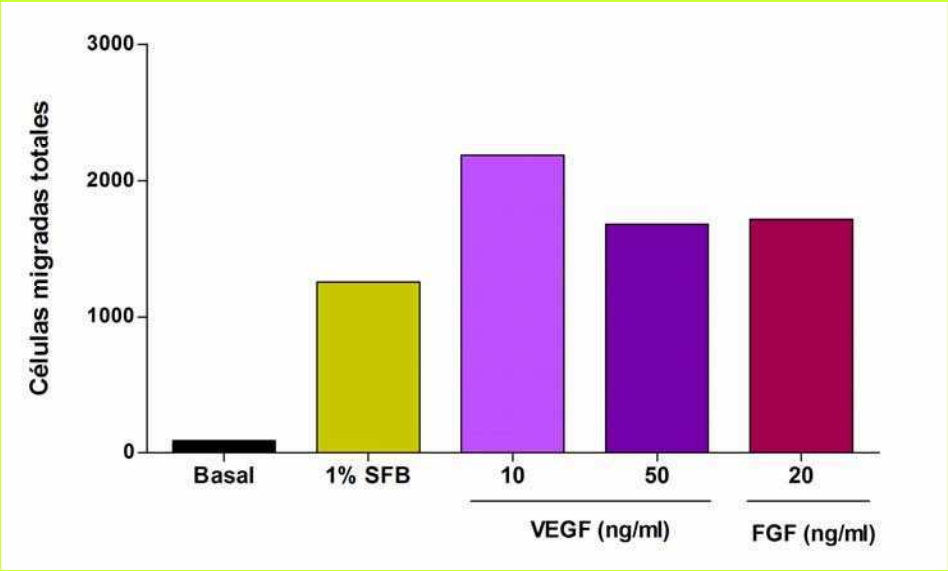


Figura 24. Migración de HEEC en presencia de distintos estímulos. Luego de 15-18 horas de hambreado de nutrientes, se incubaron 25.000 células en el sistema de migración durante 20 h en presencia de medio EBM con distintas estímulos: 1% SFB, 10 ng/ml de VEGF, 50 ng/ml de VEGF, 20 ng/ml de FGF. Cada condición experimental se ensayó por duplicado y se contaron las células totales migradas. Este ensayo carece de estadística porque se realizó como análisis cualitativo preliminar.

En la figura 25 se muestran imágenes representativas de la respuesta migratoria de HEEC frente a los distintos estímulos.

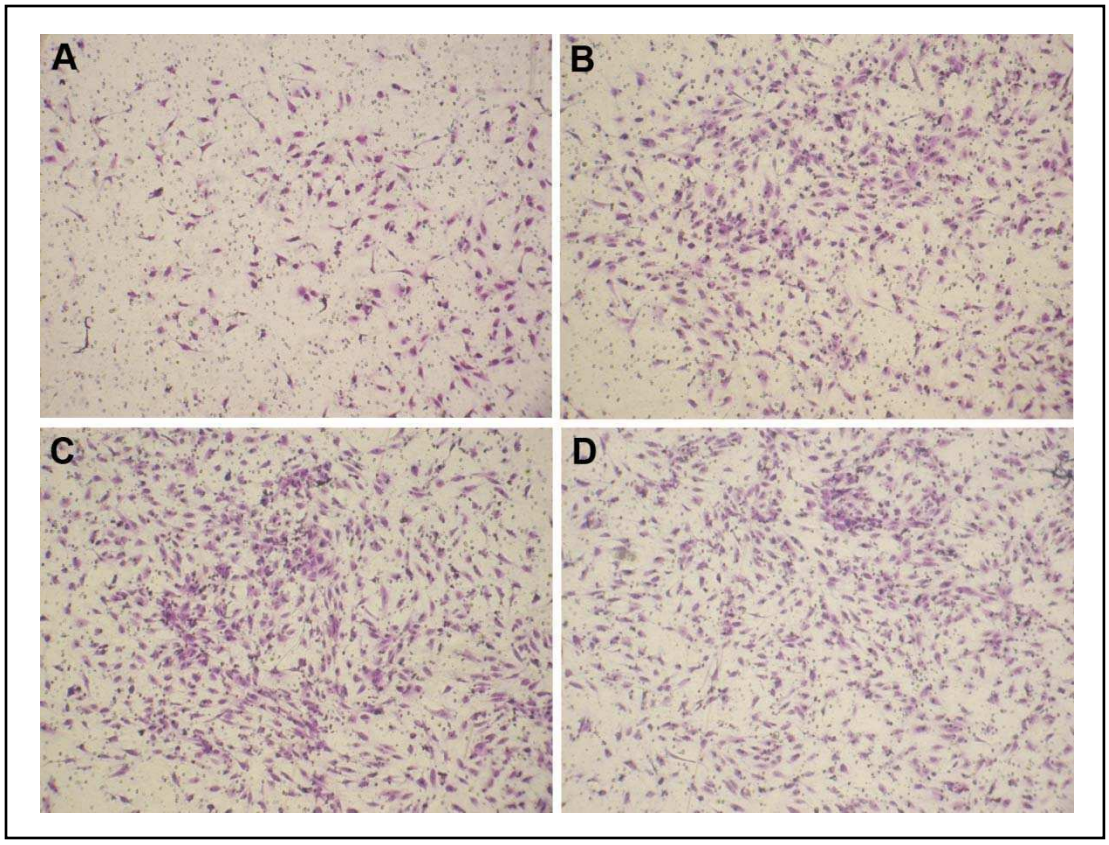


Figura 25. Fotografías de migración de HEEC. A) Basal. **B)** 10 ng/ml de VEGF. **C)** 50 ng/ml de VEGF. **D)** 20 ng/ml de FGF. Aumento: 100X

Dado que las células mostraron poseer capacidad migratoria aún en ausencia de cualquier estímulo, decidimos estudiar los efectos sobre su migración basal.

EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA MIGRACIÓN DE HEEC

Luego de observar el efecto inhibitorio de la terapéutica natural con resveratrol sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas inducidas *in vivo*, y de identificar un efecto claro sobre la densidad vascular de las lesiones a pesar de no alcanzar una disminución estadísticamente significativa sobre los niveles de VEGF peritoneales, nos propusimos estudiar su efecto directo sobre la migración de HEEC *in vitro*.

Observamos que el resveratrol inhibe la migración de HEEC de manera dosis dependiente (Figura 26). El estímulo con resveratrol mostró a concentraciones de 50 µM y 100 µM una migración de 34,24 ± 10,09% ($p<0,05$ vs. Basal) y 22,96 ± 6,06% ($p<0,01$ vs. Basal) respectivamente.

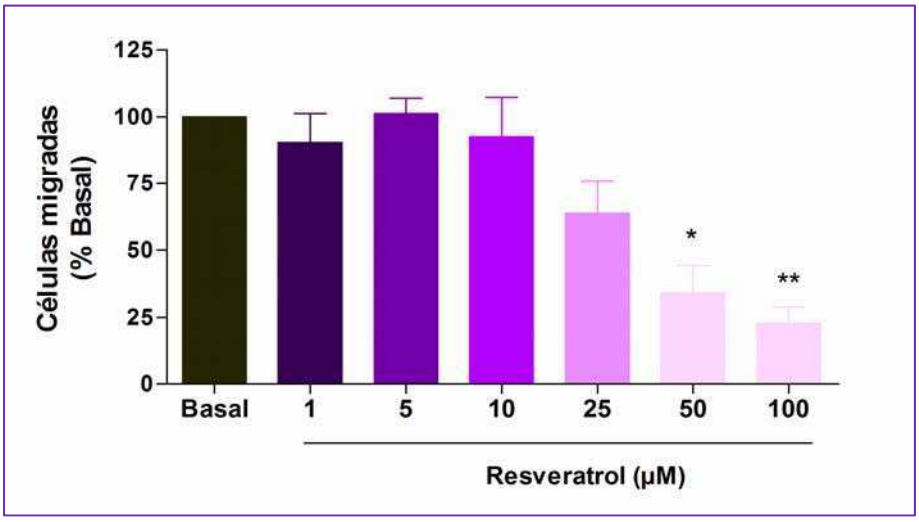


Figura 26. Efecto del resveratrol sobre la migración de HEEC. Luego de 15-18 h de hambreado de nutrientes, se incubaron 20.000 células en el sistema de migración durante 20 h en presencia de medio EBM con distintas concentraciones de resveratrol. Los resultados se expresaron como porcentaje del basal (0 µM) para cada ensayo. Cada condición experimental se ensayó por duplicado. Se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Kruskal-Walllis. *p<0,05 / **p<0,01 vs. Basal. n= 6

En la figura 27 se muestran imágenes representativas de la respuesta migratoria de HEEC frente a las concentraciones de resveratrol que mostraron inhibición significativa.

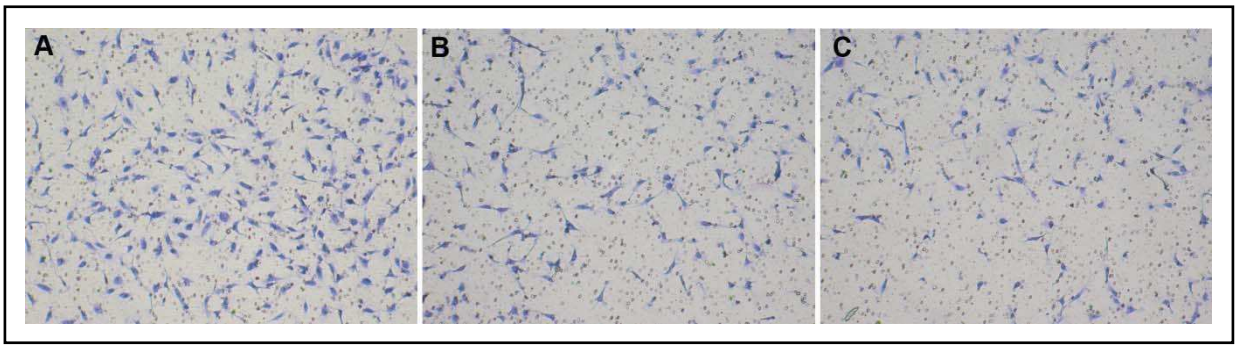


Figura 27. Fotografías de migración de HEEC. A) Basal. **B)** resveratrol 50 µM. **C)** resveratrol 100 µM. Aumento: 100X

Postulamos entonces que el efecto del resveratrol observado sobre la densidad vascular de las lesiones endometriósicas en el modelo de endometriosis *in vivo*, podría deberse en parte a una inhibición sobre la migración de las células endoteliales.

EFECTO DEL TEJIDO ENDOMETRIAL SOBRE LA MIGRACIÓN DE HEEC

Con el objetivo de profundizar en el proceso que lleva al establecimiento de las lesiones endometriósicas, estudiamos inicialmente la influencia del diagnóstico del tejido endometrial eutópico sobre la migración de HEEC y no observamos diferencias significativas (Figura 28). En presencia de medio condicionado de explantes de tejido eutópico proveniente de pacientes con endometriosis, se observó un promedio de 63,83 ± 28,45 células migradas, mientras que en presencia de medio condicionado de explantes de tejido eutópico proveniente de mujeres control observamos un promedio de 74,10 ± 31,04 células migradas.

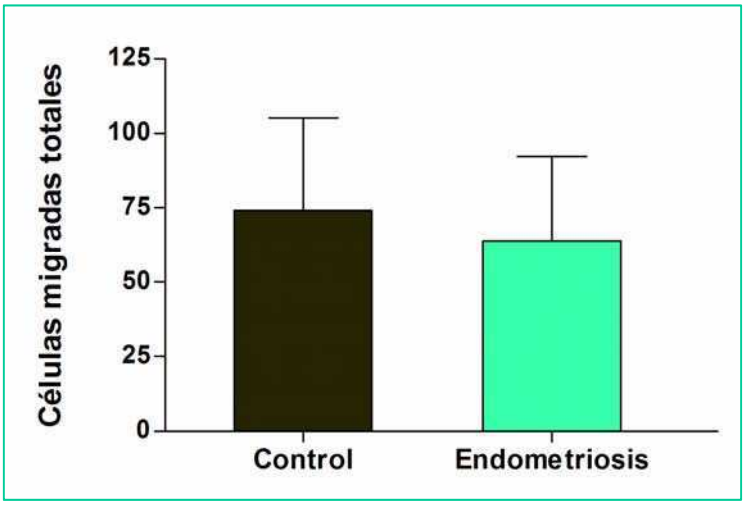


Figura 28. Efecto del tejido endometrial eutópico sobre la migración de HEEC. Luego de cultivar por 24 h explantos de tejido eutópico provenientes de mujeres controles y de pacientes con endometriosis, se levantaron los medios (MC) y se centrifugaron a 1500 rpm. Se incubaron 20.000 células previamente hambreadas en el sistema de migración durante 20 h en presencia de 75% de medio EBM y 25% de MC de eutópicos controles o MC de eutópicos con endometriosis. Cada condición experimental se ensayó por duplicado. Los resultados se expresaron como células migradas totales y se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student. n= 6 (Control), n= 8 (Endometriosis).

Considerando entonces que al parecer no existen diferencias intrínsecas asociadas al diagnóstico sobre el efecto del tejido eutópico en la migración endotelial; y teniendo en cuenta que la migración de estas células es crucial en el proceso de angiogénesis, el cual resulta fundamental en el desarrollo de las lesiones endometriósicas en un sitio ectópico, nos propusimos analizar y comparar el efecto del tejido ectópico sobre la migración de HEEC respecto del eutópico de pacientes con endometriosis (Figura 29). En presencia de medio condicionado de tejido eutópico se obtuvo un promedio de 37,10 ± 11,92 células migradas, mientras que en presencia de medio condicionado de tejido ectópico se obtuvo un promedio de 195 ± 7,06 células migradas ($p<0,001$ vs Eutópico).

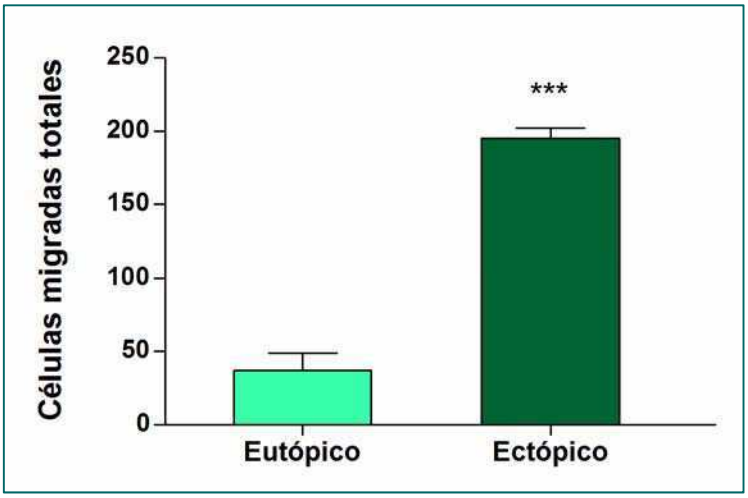


Figura 29. Efecto del tejido endometrial ectópico sobre la migración de HEEC. Luego de cultivar por 24 h explantos de tejido eutópico y ectópico provenientes de pacientes con endometriosis, se levantaron los medios condicionados (MC) y se centrifugaron a 1500 rpm. Se incubaron 20.000 células previamente hambreadas en el sistema de migración durante 20 h en presencia de 75% de medio EBM y 25% de MC Eutópico o MC Ectópico. Cada condición experimental se ensayó por duplicado. Los resultados se expresaron como células migradas totales y se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student. ***$p<0,001$ vs. Eutópico. n= 8.

Se deduce entonces que el tejido ectópico, presente en las pacientes con endometriosis, posee capacidad estimulatoria de la migración de las células endoteliales, la cual no se observa en el tejido eutópico respectivo de las mismas pacientes.

EFECTO DEL LÍQUIDO PERITONEAL DE PACIENTES SOBRE LA MIGRACIÓN DE HEEC

Frente al hallazgo de un claro efecto inductor de la migración de HEEC en presencia de medios condicionados de tejido ectópico, resultó de gran interés analizar el efecto del líquido peritoneal proveniente de mujeres control y de pacientes con endometriosis.

Observamos que el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis aumenta la migración de las HEEC respecto de la que presentan frente al líquido peritoneal de mujeres controles (Figura 30). En presencia de líquido peritoneal control se observó un promedio de células migradas de 221,8 ± 66,04, y en presencia de líquido peritoneal de pacientes con endometriosis el promedio aumentó a 457 ± 61,46 ($p<0,05$ vs. LP Control).

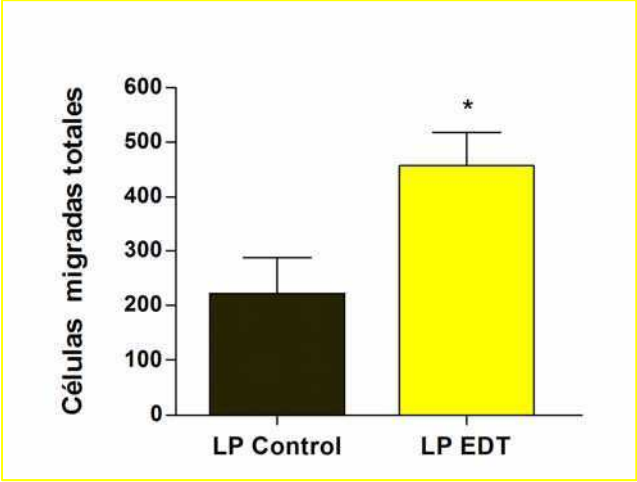


Figura 30. Efecto del líquido peritoneal de pacientes sobre la migración de HEEC. Se incubaron 20.000 células previamente hambreadas en el sistema de migración durante 20 h en presencia de 75% de medio EBM y 25% del líquido peritoneal de mujeres control (LP Control) o de pacientes con endometriosis (LP EDT). Cada condición experimental se ensayó por duplicado. Los resultados se expresaron como células migradas totales y se analizaron las medias ± error estándar. Análisis estadístico: Test t de Student. *$p<0,05$ vs. LP Control. n= 7 (LP Control), n= 6 (LP EDT).

Podríamos deducir entonces que los factores presentes en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis serían en parte responsables del aumento en la respuesta migratoria de las células endoteliales, y serían liberados por el tejido endometrial ectópico.

DISCUSIÓN

La endometriosis es una enfermedad crónica, recurrente y en muchos casos progresiva, cuyos principales síntomas asociados son el dolor y la infertilidad (3). A pesar de tratarse de una enfermedad benigna, tiene un gran impacto sobre la calidad de vida de las mujeres que la padecen, afectando su bienestar físico y emocional, y consecuentemente su vida social y privada (54).

Como expusimos previamente, las terapias médicas disponibles actualmente para tratar la endometriosis tienden a calmar el dolor y facilitar la regresión de las lesiones endometriósicas, principalmente induciendo un estado de hipoestrogenismo, basadas en la dependencia de estrógenos que presenta el endometrio ectópico (49,181). Si bien estos tratamientos no son curativos en sí, hoy en día constituyen el único recurso disponible (54,56). Sin embargo, los avances en la terapéutica de la endometriosis resultan aún insuficientes debido a las altas recidivas de la enfermedad y los efectos adversos que presentan los distintos tratamientos, por lo cual el esfuerzo aún está enfocado en el mejoramiento y el desarrollo de nuevas estrategias que tengan como objetivo alcanzar una mejor eficacia con menores efectos colaterales.

Por esta razón uno de los objetivos generales de este trabajo fue el de estudiar nuevos mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, a los cuales apuntar a la hora de considerar nuevos tratamientos y al mismo tiempo buscar estrategias que resulten más inocuas para las pacientes. De esta manera nos centramos en el estudio de posibles terapias antiangiogénicas y naturales para el tratamiento de la endometriosis.

Como primera aproximación nos propusimos estudiar el efecto de las terapias en un modelo *in vivo* de endometriosis inducida quirúrgicamente en ratones BALB/c, evaluando la proliferación y la apoptosis celular de las lesiones endometriósicas, así como también su densidad vascular y los niveles de VEGF peritoneales.

Por otra parte, el endometrio eutópico de las pacientes ha sido extensamente estudiado dada su importancia en la patogénesis de la endometriosis, y es sabido que posee características diferentes a las del endometrio de mujeres sanas en lo que respecta a su capacidad de implantarse y sobrevivir en un sitio ectópico.

La proliferación celular y la apoptosis son las dos vías principales que normalmente regulan el crecimiento celular y la homeostasis. Tanto nuestro grupo como otros autores han

demostrado que el endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis posee niveles de apoptosis espontánea disminuidos, y niveles de proliferación celular aumentados, en comparación con los niveles que presenta el endometrio de mujeres sanas (182). Por este motivo, se ha propuesto que este aumento en la viabilidad celular podría facilitar las características invasivas del tejido (168,183,184). Estos antecedentes nos condujeron a estudiar el impacto directo de las terapias sobre ambos procesos, para lo cual utilizamos cultivos primarios de células epiteliales provenientes de biopsias de endometrio eutópico humano.

A pesar de que las células utilizadas no fueron obtenidas directamente de lesiones endometriósicas y su respuesta *in vitro* podría no ser idéntica, el uso de cultivos de corto plazo de células endometriales de tejido eutópico, ha sido aceptado como modelo de estudio ya que permite establecer un correcto paralelismo con las células ectópicas que conforman las lesiones (170,180,185-187).

TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS

Como señalamos a lo largo de este trabajo, en los últimos años se ha demostrado que las lesiones endometriósicas están altamente vascularizadas, y está ampliamente aceptado que la angiogénesis es crítica para el establecimiento y el crecimiento del tejido endometrial en sitios ectópicos (13,72).

A lo largo de la última década se han realizado numerosos estudios que han adjudicado un rol principal al VEGF en la regulación de la angiogénesis fisiológica y patológica (188). Además se han evaluado diversos métodos para inhibir la vascularización durante la metástasis del cáncer con resultados alentadores (189-191). El VEGF es probablemente el factor angiogénico más estudiado y se ha demostrado que está involucrado en la fisiopatología de la endometriosis. Se han encontrado altos niveles de expresión de VEGF en lesiones endometriósicas, así como también niveles aumentados en el endometrio eutópico y en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis en comparación con pacientes control (20,77,81,192). Estas observaciones conducen a la idea de que la supresión de la angiogénesis a través de la inhibición del VEGF podría ser una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de esta patología (69,84,193).

Diversos estudios han ensayado el efecto de algunos agentes inhibitorios del proceso de angiogénesis, tales como SU5416, SU6668, TNP-470, endostatina, anginex y cabergolina

(85,86,194-196). Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de estos tratamientos antiangiogénicos han sido probados en modelos murinos de animales inmunodeficientes.

Considerando que el sistema inmune tiene un rol de suma importancia en la patogénesis de la endometriosis (90,93) nos resultó de gran interés evaluar el efecto de una nueva terapéutica antiangiogénica con bevacizumab en un modelo de endometriosis inducida en ratones BALB/c.

Previamente, dado que se ha demostrado la importante participación de los macrófagos en la síntesis de VEGF, y considerando la falta de información bibliográfica respecto del modelo de endometriosis en ratón utilizado a lo largo de este trabajo, nos propusimos estudiar si existía una variación en la actividad de los macrófagos peritoneales según la presencia o ausencia de la enfermedad.

Trabajos previos de Chen y col. realizados en otro modelo de endometriosis en ratones BALB/c, reportaron cambios en el patrón de citoquinas tales como IL-1β, TNF-α, VEGF y MCP-1 (179). De esta manera, los autores sugirieron una relación entre los niveles de estas citoquinas y el nivel de progresión y desarrollo de la enfermedad (179). Asimismo, otro grupo demostró en un modelo de endometriosis en ratones C57BL ovariectomizados, que tanto los neutrófilos como los macrófagos, podían promover la angiogénesis en etapas tempranas de la enfermedad. Del mismo modo, las citoquinas TNF-α, IL-6 y las quemoquinas proteína inflamatoria del macrófago 1 (MIP-1) y proteína inflamatoria del macrófago 2 (MIP-2), presentes en el fluido peritoneal, amplificarían la señal angiogénica para inducir el crecimiento del tejido endometrial ectópico (90). En este trabajo, los autores demuestran una mayor producción de VEGF por parte de neutrófilos y macrófagos *in vitro*, inducida por TNF-α e IL-6. Sin embargo, no observaron diferencias entre animales con endometriosis inducida y animales control.

Finalmente, pudimos corroborar que el modelo experimental que utilizamos resulta útil para estudiar el proceso de angiogénesis en endometriosis ya que de manera similar a lo que ocurre con los macrófagos provenientes de pacientes enfermas, los macrófagos peritoneales de los ratones con endometriosis inducida producen elevados niveles de VEGF in vitro en relación a los controles.

Siendo así, proseguimos con el estudio de los efectos del bevacizumab sobre el desarrollo de la endometriosis en el modelo murino.

Teniendo en cuenta que las pacientes acuden a una consulta médica una vez que los

síntomas se manifiestan y para entonces las lesiones endometriósicas ya se han instalado, resulta clave la búsqueda de terapias que puedan inhibir las lesiones establecidas. Por lo tanto, nos resultó oportuno no sólo evaluar el efecto *in vivo* de un nuevo tratamiento antiangiogénico en animales inmunocompetentes, sino también estudiar su capacidad de actuar pasada la etapa inicial de implantación de las lesiones, simulando así una fase más avanzada de la enfermedad. De esta manera podríamos confirmar si un tratamiento antiangiogénico que tenga como blanco inhibir el mantenimiento de lesiones ya establecidas resulta una posible nueva terapéutica para tratar la endometriosis.

Observamos que el tratamiento con bevacizumab inhibió el desarrollo de las lesiones reduciendo la proliferación celular y aumentando los niveles de apoptosis de las células epiteliales que las conforman. Además, demostramos que el tratamiento reduce los niveles de VEGF en el líquido peritoneal y consecuentemente la densidad vascular en las lesiones.

Teniendo en cuenta el rol de la angiogénesis patológica, se ha postulado que estos agentes inhibitorios deberían prevenir la implantación y la progresión de la endometriosis sin esperarse la regresión de las lesiones ya establecidas. En consecuencia, no observamos un efecto significativo del bevacizumab sobre el número de lesiones endometriósicas establecidas por ratón. Sin embargo, Nap y col. hallaron en un modelo de ratones inmunodeficientes que algunos agentes angiostáticos reducían significativamente el número de lesiones desarrolladas (85), aun habiendo iniciado el tratamiento a las tres semanas de realizada la cirugía. No obstante, el tamaño de las lesiones endometriósicas o los mecanismos por los cuales el número de lesiones fue reducido no fueron evaluados por los autores.

Por otra parte, Laschke y col. demostraron en hámster que una inhibición combinada del VEGF, del factor de crecimiento de fibroblastos y del factor de crecimiento derivado de plaquetas, reduce la vascularización de las lesiones endometriósicas; sin observar un efecto significativo al inhibir únicamente el VEGF (194). Asimismo, los autores no observaron una reducción significativa del tamaño de las lesiones con ninguno de los tratamientos ensayados. Sin embargo, en nuestro modelo encontramos que el porcentaje de área vascularizada y el tamaño de las lesiones endometriósicas en el grupo tratado con bevacizumab, eran significativamente menores que en el grupo Control, lo cual estaría sugiriendo que el bloqueo único de VEGF podría resultar en efectos antiangiogénicos y antiproliferativos.

Se ha demostrado recientemente que el VEGF protege al endotelio y al estroma endometrial humano de la apoptosis (197,198). Además la inhibición de la expresión de VEGF

induce apoptosis y reduce la proliferación celular en varios modelos, tanto *in vitro* como *in vivo* (199,200). Confirmando estas observaciones, en nuestro trabajo encontramos que el tratamiento antiangiogénico aumenta los niveles de apoptosis y reduce la proliferación celular en la fracción epitelial de la lesión endometriósica. Esto podría estar sugiriendo un posible mecanismo para la reducción del tamaño de la lesión observada.

Recientemente, las propiedades inhibitorias y neutralizantes que el bevacizumab ejerce sobre el VEGF, fueron demostradas satisfactoriamente en una amplia variedad de modelos *in vitro* (201). A pesar de que Ferrara y col. reportaron que el bevacizumab se une al VEGF y neutraliza todas las isoformas de VEGF-A humanas, no así las de roedores (107); otros grupos han demostrado que el bevacizumab se une al VEGF murino, aunque con baja afinidad (162). Este punto resulta controversial y se han desarrollado numerosos estudios para esclarecer la afinidad del anticuerpo (162,202). En este trabajo, nuestras observaciones avalan los resultados obtenidos por Bock y col. (162) sugiriendo que el bevacizumab se une al VEGF murino, a partir de la clara inhibición observada sobre el crecimiento y sobre el área vascularizada de las lesiones endometriósicas en ratones BALB/c. Más aún, Nakamura y col. expusieron que el VEGF-A humano muestra un alto grado de homología con el VEGF-A murino (203).

Cabe destacar que la capacidad del bevacizumab de inhibir la angiogénesis ha sido ensayada en pacientes oncológicos con éxito (107,204). En este trabajo pudimos demostrar su eficacia inhibiendo la angiogénesis involucrada en el desarrollo de la endometriosis experimental, lo cual nos conduciría a la idea de un nuevo tratamiento potencial. Sin embargo es importante aclarar los efectos adversos que podrían ocurrir ocasionalmente, tales como proteinuria, hipertensión o hemorragias (94,205).

Paralelamente al uso del bevacizumab, para lograr un panorama más amplio de los efectos de la terapia antiangiogénica sobre el modelo murino de endometriosis, evaluamos también el efecto de un anticuerpo policlonal murino dirigido contra VEGF. Sin embargo, a pesar de haber demostrado la importancia de la angiogénesis en el desarrollo de esta patología con el bevacizumab, no obtuvimos resultados significativos con este anticuerpo. Teniendo en cuenta que el protocolo del tratamiento fue distinto que con bevacizumab, la falta de efecto observado podría deberse a la baja cantidad de aplicaciones, así como también a la dosis utilizada. Por otra parte, cabe destacar que se trata de un anticuerpo novedoso, recientemente desarrollado, y serían necesarios más estudios para comprobar su eficacia.

En resumen, esta parte de nuestro trabajo confirma que la angiogénesis es requisito para el mantenimiento y el avance de la endometriosis, ya que una terapia antiangiogénica inhibe efectivamente el crecimiento de lesiones endometriósicas ya establecidas.

A pesar de los recientes avances en este campo, aún quedan interrogantes por dilucidar sobre los mecanismos reguladores de este proceso dinámico y complejo de vascularización en las lesiones (206). Es necesaria una mayor investigación para evaluar si el bevacizumab podría ser una herramienta útil, o bien para encontrar un compuesto antiangiogénico que resulte más adecuado y con menores efectos colaterales para tratar a las pacientes que padecen esta patología.

TRATAMIENTOS NATURALES

A lo largo de la última década, el uso de compuestos naturales, suplementos multivitamínicos, minerales y otros componentes derivados de plantas para tratar diferentes enfermedades ha ido cobrando mayor prevalencia. En los últimos años se ha demostrado que la medicina alternativa y complementaria basada en el uso de hierbas medicinales y otros componentes botánicos con propiedades antiinflamatorias podrían ser empleados en el tratamiento del dolor asociado a la endometriosis (125).

Considerando la necesidad de una terapéutica más inocua que permita ser administrada por períodos prolongados sin provocar efectos adversos, nos interesamos en el estudio de tratamientos novedosos con compuestos naturales.

El galato de epigalocatequina (EGCG) proveniente del té verde, y el resveratrol proveniente de las uvas, son algunas de las opciones naturales que han sido consideradas últimamente en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (119,133,134,137,160).

Actualmente, el té verde es considerado uno de los agentes dietarios más prometedores en la prevención y el tratamiento contra el cáncer. Estudios previos han demostrado que el EGCG posee la capacidad de inhibir el crecimiento de varios tipos celulares tumorales humanos, tales como células de cáncer cervical (143) y células de cáncer ovárico (140), así como también células de leiomioma uterino (141,142). Sólo dos grupos reportaron recientemente la habilidad del EGCG para inhibir el desarrollo de la endometriosis (207,208). Algunas observaciones preliminares advierten que la reducción en el tamaño de las lesiones podría ser consecuencia de sus efectos

antiangiogénicos (135,207,208). Se demostró que el EGCG reduce la perfusión sanguínea de la microvasculatura dentro de las lesiones endometriósicas en un modelo de endometriosis en hámster (207), y reduce de los niveles de ARN mensajero de VEGF en las lesiones así como la densidad vascular en un modelo en ratones inmunodeficientes (208).

Sin embargo, el modelo utilizado por Laschke y col. consiste en el trasplante de tejido endometrial obtenido del útero de hámsters dadores en un pliegue subcutáneo dorsal de hámsters aceptores (207), mientras que el modelo utilizado por Xu y col. se basa en la inyección de tejido endometrial humano en ratones inmunodeficientes (208). En ambos estudios, los tratamientos comenzaron el mismo día del trasplante y se continuaron durante 15 días, administrándose a través de inyecciones intraperitoneales con el objeto de estudiar el efecto local y poder alcanzar mayores concentraciones de EGCG.

Con los mismos interrogantes que nos condujeron en el estudio de las terapias antiangiogénicas previamente discutidas, en primer lugar, nos resultó de vital interés ahondar en el efecto de este polifenol natural sobre el mantenimiento y el crecimiento de lesiones endometriósicas ya establecidas, en el modelo de endometriosis inducida en ratones inmunocompetentes.

Por otra parte, a partir de los antecedentes actuales mencionados, nos interesó avanzar en el conocimiento disponible sobre los efectos del EGCG a partir de su administración por vía oral, considerando que es la forma usual de consumo en humanos, y así poder profundizar en sus efectos metabólicos. Además es importante destacar, que según se describe en la bibliografía, menos de la mitad de las catequinas del té verde parecerían ser absorbidas por el intestino luego de la ingesta y serían rápidamente metabolizadas en sus derivados (209).

Respecto a la funcionalidad del resveratrol, se sabe que afecta a una gran variedad de eventos biológicos y sus mecanismos de acción han demostrado ser dosis dependientes (120,154,210,211). Los efectos de este polifenol han sido estudiados en la prevención y el tratamiento del carcinoma hepatocelular (212), del cáncer de mama (155), del carcinoma pulmonar de Lewis (213) y del cáncer de hígado (214), con resultados alentadores.

A partir de su similitud estructural con el estrógeno sintético, dietilestilbestrol, se ha reportado que el resveratrol es un fitoestrógeno (153,211), y que exhibe grados variables de agonismo que dependen del sistema en estudio y de sus concentraciones (215). La propiedad agonista o antagonista estrogénica del resveratrol es altamente controversial y se postula que podría depender de la abundancia relativa de receptores de estrógenos α y β que presentan los

tejidos (216). Mientras otros análogos del estrógeno poseen afinidad diferencial por los distintos receptores, el resveratrol se une a ambos con igual afinidad (153,217). Algunos autores postulan además que su capacidad agonista o antagonista depende de la presencia o ausencia de estrógeno, actuando como antagonista en presencia del mismo (134,218). Asimismo, Bhat y col. postularon que el resveratrol exhibe efectos antiproliferativos que podrían ser mediados por mecanismos tanto dependientes como independientes de estrógenos (218).

Por otra parte, existe un antecedente que demuestra la capacidad de la genisteina, también conocida por su propiedad fitoestrogénica, en provocar la regresión de los implantes endometriósicos en un modelo de endometriosis en ratas (131). En este trabajo también se reportó que la capacidad de la genisteina de actuar como agonista o antagonista de estrógenos es dependiente de los niveles de estrógenos endógenos y sus receptores.

Hasta el momento en que iniciamos nuestro trabajo, el efecto del resveratrol no había sido estudiado en el tratamiento de la endometriosis, razón por la cual decidimos comenzar conociendo su efecto local a través de la administración intraperitoneal. Sólo un estudio recientemente publicado, en un modelo de endometriosis en ratones inmunodeficientes, advierte sobre la eficacia de esta alternativa terapéutica (158). De la misma manera que con EGCG, nos interesó entonces conocer los efectos del resveratrol en el mismo modelo de endometriosis mencionado con anterioridad.

Nuestros resultados demostraron que tanto EGCG como resveratrol ejercen una inhibición significativa sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas inducidas quirúrgicamente, reduciendo su tamaño a través de un aumento en la apoptosis y una disminución en la proliferación de las células epiteliales que conforman las glándulas.

Por otra parte, resulta destacable que ambos tratamientos fueron capaces de reducir el número de lesiones desarrolladas por animal, a pesar de que un tratamiento iniciado al día 15 post-cirugía tiene como fin estudiar el efecto de la terapia sobre el crecimiento y mantenimiento de lesiones ya establecidas, y no puntualmente sobre su establecimiento. Sin embargo, la potencia de un tratamiento podría verse reflejada en una reducción total del tamaño de la lesión endometriósica y de esta manera producir un efecto en consecuencia sobre el número de lesiones encontradas.

A pesar de que han sido reportados previamente efectos anticarcinogénicos del EGCG (133,141) y algunos trabajos recientes mostraron sus efectos antiangiogénicos en endometriosis (135,208), este es el primer antecedente que demuestra la efectividad de su administración oral

en un modelo murino de endometriosis en ratones BALB/c. Asimismo, comprobamos los efectos antiproliferativos y proapoptóticos del EGCG sobre la endometriosis, de acuerdo con los observados previamente en otras patologías (140,142); y confirmamos los efectos antiangiogénicos, que se evidenciaron a través de una marcada reducción de los niveles de VEGF en el líquido peritoneal y una inhibición de la densidad vascular de las lesiones endometriósicas.

En el caso del tratamiento con resveratrol, observamos que a pesar de mostrar un efecto significativo con ambas dosis ensayadas sobre la proliferación celular y la apoptosis en las lesiones, no pudimos detectar una reducción estadísticamente significativa sobre el tamaño de las mismas con la dosis más baja. Esto nos estaría indicando que existe un efecto del tratamiento sobre las lesiones, pero que al tratarse de una dosis menor, no llega a ser efectiva en reducir el tamaño de la lesión, al menos en el tiempo de tratamiento analizado en este trabajo.

Bruner-Tran y col. demostraron recientemente que el resveratrol es capaz de reducir el desarrollo de la endometriosis experimental en ratones inmunodeficientes atribuyendo sus efectos a un aumento en la apoptosis de las células endometriales (158). Sin embargo, los efectos del resveratrol sobre la proliferación del tejido endometriósico no resultaron del todo claros. Observaron una reducción en la expresión de Ki-67 y un aumento en la expresión de PCNA, siendo ambos marcadores de proliferación celular. En contraposición, en nuestro trabajo, observamos una clara reducción de la proliferación celular reflejada en una disminución de la expresión de PCNA luego del tratamiento con resveratrol.

En un estudio previo, Brakenhielm y col. demostraron que la supresión de la angiogénesis podría ser al menos uno de los mecanismos involucrados en el efecto antitumoral propio del resveratrol y postulan que el consumo de este compuesto podría ser beneficioso en la prevención de enfermedades dependientes de la angiogénesis (156). Asimismo, numerosos estudios reportaron efectos antiangiogénicos del resveratrol en diferentes modelos de cáncer (122,155,157). En lo que respecta a la evaluación del resveratrol en endometriosis, este estudio resulta el primer reporte en el que se confirman sus propiedades antiangiogénicas observando una reducción en la densidad vascular de las lesiones endometriósicas. No obstante, los niveles de VEGF peritoneales luego de la administración de este polifenol, mostraron una disminución que no resultó ser estadísticamente significativa, al menos con las dosis ensayadas.

A partir de este resultado y con el objetivo de profundizar sobre los efectos antiangiogénicos del resveratrol, nos propusimos estudiar su efecto sobre la migración de células endoteliales endometriales humanas. Existen algunos antecedentes en otras líneas celulares que

muestran su efecto sobre la proliferación del endotelio. Un estudio realizado en células endoteliales de capilares bovinos, demostró una inhibición en el crecimiento celular mediado por los receptores de FGF y VEGF (156), mientras que en otro estudio realizado en células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVECs) se observó que dosis de resveratrol similares a las ensayadas en este trabajo eran capaces de inhibir la proliferación y la migración de HUVEC inducida por células de mieloma (157).

En este caso, observamos una inhibición dosis dependiente de la migración de las células endoteliales endometriales humanas. Este resultado preliminar sobre la capacidad del resveratrol de inhibir la migración de las células endoteliales es el primer antecedente que explicaría en parte el efecto supresor observado en la densidad vascular de las lesiones endometriósicas inducidas *in vivo*.

Para profundizar más en los efectos de estos compuestos naturales sobre el desarrollo de la endometriosis, nos interesó estudiar sus efectos directos *in vitro* sobre la supervivencia de células epiteliales endometriales (CEE) provenientes de biopsias humanas. Demostramos que, tanto el EGCG como el resveratrol, son capaces de inhibir la proliferación e inducir la apoptosis de células epiteliales endometriales humanas.

De acuerdo a la bibliografía este es el primer reporte donde se evalúan las respuestas de cultivos primarios de CEE bajo distintas dosis de ambos polifenoles. Sólo existe un estudio reciente, desarrollado por Bruner-Tran y col., donde se observó la capacidad del resveratrol de ejercer un efecto inhibitorio sobre el poder invasivo de células estromales endometriales provenientes de endometrio eutópico de mujeres sanas (158). Sin embargo, a pesar del resultado alentador, los autores resaltaron la necesidad de estudiar sus efectos sobre la invasión de células estromales provenientes de lesiones endometriósicas y/o de células endometriales provenientes de tejido eutópico de pacientes con endometriosis (158).

Como mencionamos previamente, otro de los puntos clave en los que se enfoca la búsqueda de nuevas terapias es en reducir los efectos secundarios, permitiendo tratamientos prolongados, que además sean compatibles con la posibilidad de lograr un embarazo. Ambos polifenoles demostraron tener buena tolerancia en estudios farmacocinéticos de fase I en humanos, careciendo a la vez de efectos adversos (144,145,219,220).

Por otra parte, cabe destacar que en este trabajo observamos que ninguno de los tratamientos interfirió con el ciclo estral de los animales. Asimismo, un estudio realizado en ratas demostró que la administración oral diaria de 1000 mg/kg de EGCG durante los primeros 15 días

de gestación no mostraba señales de toxicidad a nivel reproductivo, ni signos de teratogenicidad (221). Años más tarde, Isbrucker y col. reportaron la falta de teratogenicidad observada luego de administrar 1000 mg/kg de EGCG durante la organogénesis en ratas (222). Por otro lado, destacaron que la falta de efectos secundarios en un estudio piloto con una concentración plasmática de 191 µg/ml de EGCG, alcanzada por administración subcutánea en ratas, indica que el EGCG no resulta teratogénico (222). No obstante, la administración subcutánea maximiza las concentraciones de EGCG, sin resultar extrapolables a los niveles encontrados en el plasma humano luego del consumo oral. De esta manera, Ullmann y col. reportaron concentraciones plasmáticas humanas máximas de 963 ng/ml luego de una única toma de 800 mg de EGCG (223), y luego de 10 días se incrementaron a 2800 ng/ml (224). Estos niveles muestran una relación 1/69 con los observados en los estudios en ratas previamente mencionados.

A partir de estudios realizados a lo largo de dos generaciones en ratas, frente a distintas dosis de EGCG, se determinó de manera conservativa que una dosis de 200 mg/kg/día representa el máximo nivel sin efectos adversos observados (222). Sin embargo, estos trabajos resaltan que el único efecto secundario observado con una dosis de 1000 mg/kg/día fue pérdida de peso en algunas crías de la primera generación. Es importante destacar que en nuestro trabajo obtuvimos efectos inhibitorios del EGCG sobre el desarrollo de la endometriosis con dosis destacadamente menores.

Asimismo, estudios realizados en ratas sobre la toxicidad embrio-fetal del resveratrol, mostraron que concentraciones de hasta 750 mg/kg/día son bien toleradas y no presentan efectos secundarios sobre el embrión ni anormalidades fetales (220). Por otra parte, Crowell y col. determinaron que el máximo nivel de resveratrol sin efectos adversos observados en ratas es de 300 mg/kg, siendo el riñón el órgano blanco de toxicidad observada en animales tratados con dosis de 3000 mg/kg (225).

Nuevamente, es necesario destacar que en este trabajo, los efectos inhibitorios del resveratrol sobre el desarrollo de la endometriosis, fueron observados con dosis considerablemente menores.

En resumen, nuestras observaciones resultan promisorias y avalan continuar estudiando estas dos terapéuticas naturales, EGCG y resveratrol, como alternativas novedosas para tratar la endometriosis. Es necesario continuar estudiando otros parámetros y realizar una investigación más exhaustiva para poder definir de manera más precisa cuáles son los mecanismos de acción de

estos polifenoles que participan del efecto observado sobre el desarrollo de las lesiones endometriósicas.

EL TEJIDO ENDOMETRIAL ECTÓPICO Y EL LÍQUIDO PERITONEAL PARTICIPAN DE LA INDUCCIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN ENDOMETRIOSIS

Como último enfoque nos interesó profundizar en la relación entre el ambiente peritoneal y la migración de las células endoteliales endometriales, un paso crucial en el proceso angiogénico que tiene lugar durante el desarrollo de las lesiones endometriósicas.

El efecto inductor del líquido peritoneal de pacientes con endometriosis sobre la proliferación de células endometriales estromales ha sido ampliamente estudiado y aceptado (226,227). Por otra parte, se ha postulado que en las pacientes que padecen esta patología, el ambiente intraperitoneal posee una conjunción favorable de factores y procesos que inician la enfermedad o al menos facilitan su desarrollo (34,192).

Se sabe además que en pacientes con endometriosis existe una alteración en la función de los macrófagos peritoneales, células citotóxicas naturales y linfocitos (176,177). Más aún, factores de crecimiento y mediadores del proceso inflamatorio presentes en el líquido peritoneal, producidos principalmente por los macrófagos peritoneales, están alterados en presencia de la enfermedad, indicando la participación de las células del sistema inmune en la patogénesis de la endometriosis (34).

En este trabajo, observamos que el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis aumenta la migración de células endoteliales endometriales en comparación con la migración observada en presencia del líquido peritoneal de mujeres controles. Frente a estos resultados confirmamos la presencia de factores que participan en el desarrollo de las lesiones endometriósicas induciendo la migración de las células endoteliales endometriales y facilitando el proceso angiogénico, y postulamos que en parte esos factores son liberados por el tejido endometrial ectópico.

CONCLUSIÓN FINAL

En la presente tesis se demostró que:

- Los macrófagos peritoneales provenientes de ratones con endometriosis inducida experimentalmente producen mayores niveles de VEGF *in vitro* que aquellos provenientes de ratones sin endometriosis.

- El bevacizumab, el EGCG y el resveratrol, inhiben el desarrollo de la endometriosis en un modelo experimental *in vivo* en ratones BALB/c, a través de una reducción en la proliferación y un aumento en la apoptosis de las células epiteliales que conforman las lesiones; así como también reduciendo la vascularización de las lesiones endometriósicas.

- El EGCG reduce los niveles de VEGF peritoneales.

- El resveratrol inhibe la migración de células endoteliales endometriales humanas.

- Ambos polifenoles naturales poseen un efecto directo *in vitro* sobre células epiteliales endometriales humanas, inhibiendo la proliferación e induciendo la apoptosis de las mismas.

- Factores liberados por el tejido endometrial ectópico, presentes en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis favorecen la migración de las células endoteliales endometriales humanas.

En resumen, en este trabajo hemos estudiado nuevas estrategias para el tratamiento de la endometriosis y hemos obtenido resultados alentadores, demostrando la eficacia de una terapia antiangiogénica con bevacizumab y dos terapias naturales con resveratrol y EGCG sobre el desarrollo de la enfermedad.

Si bien el tratamiento con bevacizumab mostró ser efectivo en el modelo murino, es importante tener en cuenta no sólo sus posibles efectos secundarios, sino también su costo como tratamiento. Asimismo, es importante destacar que la mayoría de los inhibidores de la

angiogénesis suelen ser suministrados por inyecciones sistémicas, lo cual también resulta costoso e inconveniente para los pacientes.

De esta manera, el hallazgo de compuestos antiangiogénicos orales representaría un gran avance en la búsqueda de un tratamiento más adecuado. Tal es así, que el uso del resveratrol y del EGCG resultan ser una opción terapéutica promisoria.

El té verde representa uno de las bebidas más consumidas en el mundo. No obstante, actualmente existen extractos de té verde disponibles como suplementos nutricionales que ofrecen una manera más simple de alcanzar las concentraciones requeridas de EGCG, sin necesidad de acudir a la ingesta de innumerables tazas de té. Del mismo modo, el consumo prolongado de productos alimenticios enriquecidos con resveratrol no resulta un tratamiento recomendable, siendo más apropiado el uso de comprimidos con las dosis necesarias.

Por otra parte, se requieren más estudios que permitan determinar las concentraciones plasmáticas efectivas de EGCG y resveratrol para alcanzar la inhibición óptima del desarrollo de las lesiones endometriósicas en pacientes, así como sus efectos sistémicos para poder esclarecer su potencial utilidad como agentes preventivos en el tratamiento de la endometriosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Galle, P.C. Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1989;16:29-42.

2. Bulun, S.E. Endometriosis. N Engl J Med 2009;360:268-279.

3. Murphy, A.A. Clinical aspects of endometriosis. Ann N Y Acad Sci 2002;955:1-10.

4. Valle, R.F. y Sciarra, J.J. Endometriosis: treatment strategies. Ann N Y Acad Sci 2003;997:229-239.

5. Rawson, J.M. Prevalence of endometriosis in asymptomatic women. J Reprod Med 1991;36:513-515.

6. ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997;67:817-821.

7. Vernon, M.W.; Beard, J.S.; Graves, K. y col. Classification of endometriotic implants by morphologic appearance and capacity to synthesize prostaglandin F. Fertil Steril 1986;46:801-806.

8. Pittaway, D.E.; Rondinone, D.; Miller, K.A. y col. Clinical evaluation of CA-125 concentrations as a prognostic factor for pregnancy in infertile women with surgically treated endometriosis. Fertil Steril 1995;64:321-324.

9. Lessey, B.A.; Castelbaum, A.J.; Sawin, S.W. y col. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 1994;79:643-649.

10. Valle, R.F. Endometriosis: current concepts and therapy. Int J Gynaecol Obstet 2002;78:107-119.

11. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol 1927;14:422-469.

12. Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1940;40:549-557.

13. Groothuis, P.G.; Nap, A.W.; Winterhager, E. y col. Vascular development in endometriosis. Angiogenesis 2005;8:147-156.

14. Halme, J.; Hammond, M.G.; Hulka, J.F. y col. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984;64:151-154.

15. Bartosik, D.; Jacobs, S.L. y Kelly, L.J. Endometrial tissue in peritoneal fluid. Fertil Steril 1986;46:796-800.

16. Ridley, J.H. y Edwards, I.K. Experimental endometriosis in the human. Am J Obstet Gynecol 1958;76:783-789.

17. Klemmt, P.A.; Carver, J.G.; Koninckx, P. y col. Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression. Hum Reprod 2007;22:3139-3147.

18. Regidor, P.A.; Vogel, C.; Regidor, M. y col. Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium. Hum Reprod Update 1998;4:710-718.

19. Zhou, H.E. y Nothnick, W.B. The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. Front Biosci 2005;10:569-575.

20. McLaren, J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. Hum Reprod Update 2000;6:45-55.

21. Olive, D.L. y Henderson, D.Y. Endometriosis and mullerian anomalies. Obstet Gynecol 1987;69:412-415.

22. Sanfilippo, J.S.; Wakim, N.G.; Schikler, K.N. y col. Endometriosis in association with uterine anomaly. Am J Obstet Gynecol 1986;154:39-43.

23. Cramer, D.W. y Missmer, S.A. The epidemiology of endometriosis. Ann N Y Acad Sci 2002;955:11-22.

24. Meyer R. Ueber den stand der frage of adenomyositis und adenomyoma in algemeinen und insbesondere ueber adenomyositis seroepithelialis und adenomyometritis sarcomatosa (in german). zel gynaecol 1919;43:745-750.

25. Novak E. Pelvic endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1931;22:826-837.

26. Schrodt, G.R.; Alcorn, M.O. y Ibanez, J. Endometriosis of the male urinary system: a case report. J Urol 1980;124:722-723.

27. Ebert, A.D.; Fuhr, N.; David, M. y col. Histological confirmation of endometriosis in a 9-year-old girl suffering from unexplained cyclic pelvic pain since her eighth year of life. Gynecol Obstet Invest 2009;67:158-161.

28. Balci, O.; Karatayli, R. y Capar, M. An incidental coexistence of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome with pelvic ectopic kidney and perirenal endometrioma. Saudi Med J 2008;29:1340-1341.

29. Rosenfeld, D.L. y Lecher, B.D. Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. Am J Obstet Gynecol 1981;139:105-

30. Van Schil, P.E.; Vercauteren, S.R.; Vermeire, P.A. y col. Catamenial pneumothorax caused by thoracic endometriosis. Ann Thorac Surg 1996;62:585-586.

31. Benagiano, G. y Brosens, I. History of adenomyosis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2006;20:449-463.

32. Valbuena, D. y Simón, C. Etiopatogenia de la endometriosis. Cuadernos de Medicina Reproductiva. 1995;1:189-211.

33. Batt, R.E.; Smith, R.A.; Buck Louis, G.M. y col. Mullerianosis. Histol Histopathol 2007;22:1161-1166.

34. Gazvani, R. y Templeton, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. Reproduction 2002;123:217-226.

35. Signorile, P.G. y Baldi, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. Int J Biochem Cell Biol 2010;42:778-780.

36. Nisolle, M. y Donnez, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. Fertil Steril 1997;68:585-596.

37. Rousseau, S. Pelvic endometriosis--the same or different entities in disguise? Fertil Steril 1998;70:590-592.

38. Maruyama, T.; Masuda, H.; Ono, M. y col. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. Reproduction 2010;140:11-22.

39. Masuda, H.; Matsuzaki, Y.; Hiratsu, E. y col. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. PLoS One 2010;5:e10387-

40. Sharpe-Timms, K.L. Endometrial anomalies in women with endometriosis. Ann N Y Acad Sci 2001;943:131-147.

41. Kennedy, S.; Bergqvist, A.; Chapron, C. y col. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Hum Reprod 2005;20:2698-2704.

42. Hurd, W.W. Criteria that indicate endometriosis is the cause of chronic pelvic pain. Obstet Gynecol 1998;92:1029-1032.

43. Martin, D.C. y Ling, F.W. Endometriosis and pain. Clin Obstet Gynecol 1999;42:664-686.

44. Giudice, L.C. y Kao, L.C. Endometriosis. Lancet 2004;364:1789-1799.

45. Mounsey, A.L.; Wilgus, A. y Slawson, D.C. Diagnosis and management of endometriosis. Am Fam Physician 2006;74:594-600.

46. Child, T.J. y Tan, S.L. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. Drugs 2001;61:1735-1750.

47. Somigliana, E.; Vercellini, P.; Vigano, P. y col. Should endometriomas be treated before IVF-ICSI cycles? Hum Reprod Update 2006;12:57-64.

48. Guo, S.W. Recurrence of endometriosis and its control. Hum Reprod Update 2009;15:441-461.

49. Kitawaki, J.; Kado, N.; Ishihara, H. y col. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. J Steroid Biochem Mol Biol 2002;83:149-155.

50. Attar, E. y Bulun, S.E. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. Hum Reprod Update 2006;12:49-56.

51. Noble, L.S.; Simpson, E.R.; Johns, A. y col. Aromatase expression in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:174-179.

52. Hudelist, G.; Czerwenka, K.; Keckstein, J. y col. Expression of aromatase and estrogen sulfotransferase in eutopic and ectopic endometrium: evidence for unbalanced estradiol production in endometriosis. Reprod Sci 2007;14:798-805.

53. Acien, P.; Velasco, I.; Gutierrez, M. y col. Aromatase expression in endometriotic tissues and its relationship to clinical and analytical findings. Fertil Steril 2007;88:32-38.

54. Mihalyi, A.; Simsa, P.; Mutinda, K.C. y col. Emerging drugs in endometriosis. Expert Opin Emerg Drugs 2006;11:503-524.

55. Allen, C.; Hopewell, S. y Prentice, A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. Cochrane Database Syst Rev 2005;CD004753-

56. Rice, V.M. Conventional medical therapies for endometriosis. Ann N Y Acad Sci 2002;955:343-352.

57. Meresman, G.F.; Auge, L.; Baranao, R.I. y col. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. Fertil Steril 2002;77:1141-1147.

58. Vercellini, P.; Somigliana, E.; Vigano, P. y col. Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. Drugs 2009;69:649-675.

59. Schweppe, K.W. Current place of progestins in the treatment of endometriosis-related complaints. Gynecol Endocrinol 2001;15 Suppl 6:22-28.

60. Vercellini, P.; Fedele, L.; Pietropaolo, G. y col. Progestogens for endometriosis: forward to the past. Hum Reprod Update 2003;9:387-396.

61. Luciano, A.A.; Turksoy, R.N. y Carleo, J. Evaluation of oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. Obstet Gynecol 1988;72:323-327.

62. Crosignani, P.; Olive, D.; Bergqvist, A. y col. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. Hum Reprod Update 2006;12:179-189.

63. Fedele, L.; Somigliana, E.; Frontino, G. y col. New drugs in development for the treatment of endometriosis. Expert Opin Investig Drugs 2008;17:1187-1202.

64. Ruhland, B.; Agic, A.; Krampe, J. y col. Innovations in conservative endometriosis treatment: an updated review. Minerva Ginecol 2011;63:247-259.

65. Nothnick, W.B. y Zhang, X. Future targets in endometriosis treatment: targeting the endometriotic implant. Mini Rev Med Chem 2009;9:324-328.

66. Ferrero, S.; Remorgida, V. y Venturini, P.L. Current pharmacotherapy for endometriosis. Expert Opin Pharmacother 2010;11:1123-1134.

67. Ferrero, S.; Abbamonte, L.H.; Anserini, P. y col. Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. Obstet Gynecol Surv 2005;60:817-826.

68. Taylor, R.N.; Lebovic, D.I. y Mueller, M.D. Angiogenic factors in endometriosis. Ann N Y Acad Sci 2002;955:89-100.

69. Taylor, R.N.; Yu, J.; Torres, P.B. y col. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. Reprod Sci 2009;16:140-146.

70. Ellis, L.M. y Hicklin, D.J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. Nat Rev Cancer 2008;8:579-591.

71. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997;386:671-674.

72. Griffioen, A.W. y Molema, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol Rev 2000;52:237-268.

73. Ferrero, S.; Ragni, N. y Remorgida, V. Antiangiogenic therapies in endometriosis. Br J Pharmacol 2006;149:133-135.

74. López, O.; Magariño, Y. y Delgado, R. The angiogenic process and cancer. Biotecnología Aplicada 2009;26:111-116.

75. McLaren, J.; Prentice, A.; Charnock-Jones, D.S. y col. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. J Clin Invest 1996;98:482-489.

76. McLaren, J.; Prentice, A.; Charnock-Jones, D.S. y col. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. Hum Reprod 1996;11:220-223.

77. Takehara, M.; Ueda, M.; Yamashita, Y. y col. Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis. Hum Pathol 2004;35:1369-1375.

78. Bourlev, V.; Volkov, N.; Pavlovitch, S. y col. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. Reproduction 2006;132:501-509.

79. Albrecht, E.D.; Babischkin, J.S.; Lidor, Y. y col. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. Hum Reprod 2003;18:2039-2047.

80. Lebovic, D.I.; Bentzien, F.; Chao, V.A. y col. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. Mol Hum Reprod 2000;6:269-275.

81. Donnez, J.; Smoes, P.; Gillerot, S. y col. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998;13:1686-1690.

82. Yin, L.R.; Sun, J.J.; Ma, H.D. y col. [Expression of interleukin1-alpha, beta and interferon-gamma in macrophages from endometrium of women with endometriosis]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 2006;41:295-298.

83. Kyama, C.M.; Overbergh, L.; Mihalyi, A. y col. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. Fertil Steril 2008;89:301-310.

84. Hull, M.L.; Charnock-Jones, D.S.; Chan, C.L. y col. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:2889-2899.

85. Nap, A.W.; Griffioen, A.W.; Dunselman, G.A. y col. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:1089-1095.

86. Becker, C.M.; Sampson, D.A.; Rupnick, M.A. y col. Endostatin inhibits the growth of endometriotic lesions but does not affect fertility. Fertil Steril 2005;84 Suppl 2:1144-1155.

87. Becker, C.M.; Sampson, D.A.; Short, S.M. y col. Short synthetic endostatin peptides inhibit endothelial migration in vitro and endometriosis in a mouse model. Fertil Steril 2006;85:71-77.

88. Becker, C.M.; Rohwer, N.; Funakoshi, T. y col. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1{alpha} and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. Am J Pathol 2008;172:534-544.

89. Becker, C.M. y D'Amato, R.J. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. Microvasc Res 2007;74:121-130.

90. Lin, Y.J.; Lai, M.D.; Lei, H.Y. y col. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. Endocrinology 2006;147:1278-1286.

91. Somigliana, E.; Vigano, P.; Gaffuri, B. y col. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. Am J Reprod Immunol 1996;36:295-300.

92. Tariverdian, N.; Theoharides, T.C.; Siedentopf, F. y col. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. Semin Immunopathol 2007;29:193-210.

93. Tariverdian, N.; Siedentopf, F.; Rucke, M. y col. Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. J Reprod Immunol 2009;80:80-90.

94. Kamba, T. y McDonald, D.M. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. Br J Cancer 2007;96:1788-1795.

95. Scarpellini, F.; Sbracia, M.; Lecchini, S. y col. Anti-angiogenesis treatment with thalidomide in endometriosis: A pilot study. Fertility and Sterility 2002;78:S87-S87.

96. Raje, N. y Anderson, K.C. Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. Curr Opin Oncol 2002;14:635-640.

97. Bando, H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. Breast Cancer 2007;14:163-173.

98. Collins, T.S. y Hurwitz, H.I. Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. Semin Oncol 2005;32:61-68.

99. Presta, L.G.; Chen, H.; O'Connor, S.J. y col. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res 1997;57:4593-4599.

100. Verhoef, C.; de Wilt, J.H. y Verheul, H.M. Angiogenesis inhibitors: perspectives for medical, surgical and radiation oncology. Curr Pharm Des 2006;12:2623-2630.

101. Dickson, P.V.; Hamner, J.B.; Sims, T.L. y col. Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. Clin Cancer Res 2007;13:3942-3950.

102. Grothey, A. y Ellis, L.M. Targeting angiogenesis driven by vascular endothelial growth factors using antibody-based therapies. Cancer J 2008;14:170-177.

103. Kumaran, G.C.; Jayson, G.C. y Clamp, A.R. Antiangiogenic drugs in ovarian cancer. Br J Cancer 2009;100:1-7.

104. Ma, W.W. y Adjei, A.A. Novel agents on the horizon for cancer therapy. CA Cancer J Clin 2009;59:111-137.

105. Carneiro, A.; Falcao, M.; Azevedo, I. y col. Multiple effects of bevacizumab in angiogenesis: implications for its use in age-related macular degeneration. Acta Ophthalmol 2009;87:517-523.

106. Lee, S.Y.; Kim, D.K.; Cho, J.H. y col. Inhibitory effect of bevacizumab on the angiogenesis and growth of retinoblastoma. Arch Ophthalmol 2008;126:953-958.

107. Ferrara, N.; Hillan, K.J. y Novotny, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. Biochem Biophys Res Commun 2005;333:328-335.

108. Chen, H.X. Expanding the clinical development of bevacizumab. Oncologist 2004;9 Suppl 1:27-35.

109. Wagner, A.D.; Arnold, D.; Grothey, A.A. y col. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. Cochrane Database Syst Rev 2009;CD005392-

110. Gaitskell, K.; Martinek, I.; Bryant, A. y col. Angiogenesis inhibitors for the treatment of ovarian cancer. Cochrane Database Syst Rev 2011;9:CD007930-

111. Perren, T.J.; Swart, A.M.; Pfisterer, J. y col. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. N Engl J Med 2011;365:2484-2496.

112. Burger, R.A.; Brady, M.F.; Bookman, M.A. y col. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. N Engl J Med 2011;365:2473-2483.

113. Fraser, H.M. y Lunn, S.F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. Br Med Bull 2000;56:787-797.

114. Anderson, F.W. y Johnson, C.T. Complementary and alternative medicine in obstetrics. Int J Gynaecol Obstet 2005;91:116-124.

115. Fugh-Berman, A. y Kronenberg, F. Complementary and alternative medicine (CAM) in reproductive-age women: a review of randomized controlled trials. Reprod Toxicol 2003;17:137-152.

116. Varma, R.; Rollason, T.; Gupta, J.K. y col. Endometriosis and the neoplastic process. Reproduction 2004;127:293-304.

117. Somers-Edgar, T.J.; Scandlyn, M.J.; Stuart, E.C. y col. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ER alpha-breast cancer cell growth in vitro and in vivo. Int J Cancer 2008;122:1966-1971.

118. Bishayee, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. Cancer Prev Res (Phila Pa) 2009;2:409-418.

119. Chen, D.; Wan, S.B.; Yang, H. y col. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. Adv Clin Chem 2011;53:155-177.

120. Athar, M.; Back, J.H.; Kopelovich, L. y col. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. Arch Biochem Biophys 2009;486:95-102.

121. Dann, J.M.; Sykes, P.H.; Mason, D.R. y col. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in endometrial tumour cells by resveratrol and EGCG. Gynecol Oncol 2009;113:374-378.

122. Trapp, V.; Parmakhtiar, B.; Papazian, V. y col. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. Angiogenesis 2010;

123. Tseng, S.H.; Lin, S.M.; Chen, J.C. y col. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. Clin Cancer Res 2004;10:2190-2202.

124. Jeong, S.J.; Koh, W.; Lee, E.O. y col. Antiangiogenic phytochemicals and medicinal herbs. Phytother Res 2011;25:1-10.

125. Wieser, F.; Cohen, M.; Gaeddert, A. y col. Evolution of medical treatment for endometriosis: back to the roots? Hum Reprod Update 2007;13:487-499.

126. Flower, A.; Liu, J.P.; Chen, S. y col. Chinese herbal medicine for endometriosis. Cochrane Database Syst Rev 2009;CD006568-

127. Wieser, F.; Yu, J.; Park, J. y col. A botanical extract from channel flow inhibits cell proliferation, induces apoptosis, and suppresses CCL5 in human endometriotic stromal cells. Biol Reprod 2009;81:371-377.

128. Pavone, M.E.; Reierstad, S.; Sun, H. y col. Altered retinoid uptake and action contributes to cell survival in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:E300-E309.

129. Wieser, F.; Shen, Z. y Sidell, N. Retinoic acid suppresses growth of endometriotic implants in an immunocompetent mouse model of endometriosis. Fertility & Sterility 2010;94:S41-

130. Swarnakar, S. y Paul, S. Curcumin arrests endometriosis by downregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. Indian J Biochem Biophys 2009;46:59-65.

131. Yavuz, E.; Oktem, M.; Esinler, I. y col. Genistein causes regression of endometriotic implants in the rat model. Fertil Steril 2007;88:1129-1134.

132. Laschke, M.W.; Schwender, C.; Vollmar, B. y col. Genistein does not affect vascularization and blood perfusion of endometriotic lesions and ovarian follicles in dorsal skinfold chambers of Syrian golden hamsters. Reprod Sci 2010;17:568-577.

133. Khan, N. y Mukhtar, H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. Cancer Lett 2008;269:269-280.

134. Cucciolla, V.; Borriello, A.; Oliva, A. y col. Resveratrol: from basic science to the clinic. Cell Cycle 2007;6:2495-2510.

135. Xu, H.; Becker, C.M.; Lui, W.T. y col. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo. Fertil Steril 2011;96:1021-1028.

136. Nagle, D.G.; Ferreira, D. y Zhou, Y.D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. Phytochemistry 2006;67:1849-1855.

137. Zaveri, N.T. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life Sci 2006;78:2073-2080.

138. Cao, Y. y Cao, R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature 1999;398:381-

139. Kondo, T.; Ohta, T.; Igura, K. y col. Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. Cancer Lett 2002;180:139-144.

140. Rao, S.D. y Pagidas, K. Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. Anticancer Res 2010;30:2519-2523.

141. Zhang, D.; Al Hendy, M.; Richard-Davis, G. y col. Green tea extract inhibits proliferation of uterine leiomyoma cells in vitro and in nude mice. Am J Obstet Gynecol 2010;202:289-289.

142. Zhang, D.; Al-Hendy, M.; Richard-Davis, G. y col. Antiproliferative and proapoptotic effects of epigallocatechin gallate on human leiomyoma cells. Fertil Steril 2010;94:1887-1893.

143. Qiao, Y.; Cao, J.; Xie, L. y col. Cell growth inhibition and gene expression regulation by (-)-epigallocatechin-3-gallate in human cervical cancer cells. Arch Pharm Res 2009;32:1309-1315.

144. Chow, H.H.; Cai, Y.; Hakim, I.A. y col. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. Clin Cancer Res 2003;9:3312-3319.

145. Chow, H.H.; Cai, Y.; Alberts, D.S. y col. Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001;10:53-58.

146. Kurahashi, N.; Sasazuki, S.; Iwasaki, M. y col. Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study. Am J Epidemiol 2008;167:71-77.

147. Bettuzzi, S.; Brausi, M.; Rizzi, F. y col. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. Cancer Res 2006;66:1234-1240.

148. Jian, L.; Xie, L.P.; Lee, A.H. y col. Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. Int J Cancer 2004;108:130-135.

149. Zhang, M.; Holman, C.D.; Huang, J.P. y col. Green tea and the prevention of breast cancer: a case-control study in Southeast China. Carcinogenesis 2007;28:1074-1078.

150. Wu, A.H. y Yu, M.C. Tea, hormone-related cancers and endogenous hormone levels. Mol Nutr Food Res 2006;50:160-169.

151. Sun, C.L.; Yuan, J.M.; Koh, W.P. y col. Green tea, black tea and colorectal cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. Carcinogenesis 2006;27:1301-1309.

152. Ahn, W.S.; Yoo, J.; Huh, S.W. y col. Protective effects of green tea extracts (polyphenon E and EGCG) on human cervical lesions. Eur J Cancer Prev 2003;12:383-390.

153. Goswami, S.K. y Das, D.K. Resveratrol and chemoprevention. Cancer Lett 2009;284:1-6.

154. Harikumar, K.B. y Aggarwal, B.B. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. Cell Cycle 2008;7:1020-1035.

155. Garvin, S.; Ollinger, K. y Dabrosin, C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. Cancer Lett 2006;231:113-122.

156. Brakenhielm, E.; Cao, R. y Cao, Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. FASEB J 2001;15:1798-1800.

157. Hu, Y.; Sun, C.Y.; Huang, J. y col. Antimyeloma effects of resveratrol through inhibition of angiogenesis. Chin Med J (Engl) 2007;120:1672-1677.

158. Bruner-Tran, K.; Osteen, K.G.; Taylor, H.S. y col. Resveratrol Inhibits Development of Experimental Endometriosis In Vivo and Reduces Endometrial Stromal Cell Invasiveness In Vitro. Biol Reprod 2010;

159. Baur, J.A. y Sinclair, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nat Rev Drug Discov 2006;5:493-506.

160. Aggarwal, B.B.; Bhardwaj, A.; Aggarwal, R.S. y col. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. Anticancer Res 2004;24:2783-2840.

161. Bilotas, M.; Meresman, G.; Stella, I. y col. Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. Fertil Steril 2010;93:2513-2518.

162. Bock, F.; Onderka, J.; Dietrich, T. y col. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:2545-2552.

163. Ricci, A.G.; Olivares, C.N.; Bilotas, M.A. y col. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition on Endometrial Implant Development in a Murine Model of Endometriosis. Reprod Sci 2011;

164. Brodie, A.; Jelovac, D. y Long, B.J. Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. Clin Cancer Res 2003;9:455S-459S.

165. Bravo, R. y Macdonald-Bravo, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. J Cell Biol 1987;105:1549-1554.

166. Kashida, S.; Sugino, N.; Takiguchi, S. y col. Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. Biol Reprod 2001;64:317-323.

167. Schlingemann, R.O.; Rietveld, F.J.; de Waal, R.M. y col. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. Lab Invest 1990;62:690-696.

168. Meresman, G.F.; Vighi, S.; Buquet, R.A. y col. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. Fertil Steril 2000;74:760-766.

169. Gavrieli, Y.; Sherman, Y. y Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501.

170. Bilotas, M.; Baranao, R.I.; Buquet, R. y col. 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.

171. Krikun, G.; Mor, G.; Huang, J. y col. Metalloproteinase expression by control and telomerase immortalized human endometrial endothelial cells. Histol Histopathol 2005;20:719-724.

172. Aldo, P.B.; Krikun, G.; Visintin, I. y col. A novel three-dimensional in vitro system to study trophoblast-endothelium cell interactions. Am J Reprod Immunol 2007;58:98-110.

173. Krikun, G.; Mor, G.; Alvero, A. y col. A novel immortalized human endometrial stromal cell line with normal progestational response. Endocrinology 2004;145:2291-2296.

174. Krikun, G.; Mor, G. y Lockwood, C. The immortalization of human endometrial cells. Methods Mol Med 2006;121:79-83.

175. Montagna, P.; Capellino, S.; Villaggio, B. y col. Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation. Fertil Steril 2008;90:156-164.

176. Hong, M. y Zhu, Q. Macrophages are activated by 17beta-estradiol: possible permission role in endometriosis. Exp Toxicol Pathol 2004;55:385-391.

177. Bacci, M.; Capobianco, A.; Monno, A. y col. Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. Am J Pathol 2009;175:547-556.

178. Eggermont, J.; Donnez, J.; Casanas-Roux, F. y col. Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. Fertil Steril 2005;84:492-499.

179. Chen, Q.H.; Zhou, W.D.; Su, Z.Y. y col. Change of proinflammatory cytokines follows certain patterns after induction of endometriosis in a mouse model. Fertil Steril 2009;

180. Olivares, C.; Bilotas, M.; Buquet, R. y col. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. Hum Reprod 2008;23:2701-2708.

181. Bulun, S.E.; Yang, S.; Fang, Z. y col. Role of aromatase in endometrial disease. J Steroid Biochem Mol Biol 2001;79:19-25.

182. Chrobak, A.; Sieradzka, U.; Sozanski, R. y col. Ectopic and eutopic stromal endometriotic cells have a damaged ceramide signaling pathway to apoptosis. Fertil Steril 2009;92:1834-1843.

183. Szymanowski, K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006;

184. Johnson, M.C.; Torres, M.; Alves, A. y col. 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-

185. Meresman, G.F.; Bilotas, M.; Abello, V. y col. Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. Fertil Steril 2005;84:459-463.

186. Fleming, H. Structure and function of cultured endometrial epithelial cells. Semin Reprod Endocrinol 1999;17:93-106.

187. Bilotas, M.; Meresman, G.; Buquet, R. y col. Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls. J Reprod Immunol 2010;84:193-198.

188. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. Semin Oncol 2002;29:10-14.

189. Asano, M.; Yukita, A.; Matsumoto, T. y col. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor121. Cancer Res 1995;55:5296-5301.

190. Mu, J.; Abe, Y.; Tsutsui, T. y col. Inhibition of growth and metastasis of ovarian carcinoma by administering a drug capable of interfering with vascular endothelial growth factor activity. Jpn J Cancer Res 1996;87:963-971.

191. Cheng, S.Y.; Huang, H.J.; Nagane, M. y col. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:8502-8507.

192. Pupo-Nogueira, A.; de Oliveira, R.M.; Petta, C.A. y col. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. Int J Gynaecol Obstet 2007;99:33-37.

193. Park, A.; Chang, P.; Ferin, M. y col. Inhibition of endometriosis development in rhesus monkeys by blocking VEGF receptor: A novel treatment for endometriosis. Fertility and Sterility 2004;82:S71-S71.

194. Laschke, M.W.; Elitzsch, A.; Vollmar, B. y col. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. Hum Reprod 2006;21:262-268.

195. Novella-Maestre, E.; Simon, C. y Pellicer, A. Modulation of angiogenesis by the dopamine agonist Cabergoline in experimentally-induced peritoneal endometriotic lesions. Fertil Steril 2007;88:S39-S40.

196. Novella-Maestre, E.; Carda, C.; Noguera, I. y col. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. Hum Reprod 2009;24:1025-1035.

197. Berkkanoglu, M.; Guzeloglu-Kayisli, O.; Kayisli, U.A. y col. Regulation of Fas ligand expression by vascular endothelial growth factor in endometrial stromal cells in vitro. Mol Hum Reprod 2004;10:393-398.

198. Yang, Z.; Mo, X.; Gong, Q. y col. Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose. Apoptosis 2008;13:1331-1343.

199. Ge, Y.L.; Zhang, X.; Zhang, J.Y. y col. The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells. Int Immunopharmacol 2009;9:389-395.

200. Carneiro, A.; Falcao, M.; Pirraco, A. y col. Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. Exp Eye Res 2009;88:522-527.

201. Wang, Y.; Fei, D.; Vanderlaan, M. y col. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. Angiogenesis 2004;7:335-345.

202. Yu, L.; Wu, X.; Cheng, Z. y col. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:522-527.

203. Nakamura, M.; Abe, Y. y Tokunaga, T. Pathological significance of vascular endothelial growth factor A isoform expression in human cancer. Pathol Int 2002;52:331-339.

204. McCarthy, M. Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. Lancet 2003;361:1959-

205. Kobold, S.; Hegewisch-Becker, S.; Oechsle, K. y col. Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? Oncologist 2009;14:1242-1251.

206. Laschke, M.W. y Menger, M.D. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. Hum Reprod Update 2007;13:331-342.

207. Laschke, M.W.; Schwender, C.; Scheuer, C. y col. Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. Hum Reprod 2008;23:2308-2318.

208. Xu, H.; Lui, W.T.; Chu, C.Y. y col. Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. Hum Reprod 2009;24:608-618.

209. Harada, M.; Kan, Y.; Naoki, H. y col. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. Biosci Biotechnol Biochem 1999;63:973-977.

210. Szende, B.; Tyihak, E. y Kiraly-Veghely, Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. Exp Mol Med 2000;32:88-92.

211. Bhat, K.P. y Pezzuto, J.M. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. Cancer Res 2001;61:6137-6144.

212. Bishayee, A.; Politis, T. y Darvesh, A.S. Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. Cancer Treat Rev 2009;

213. Kimura, Y. y Okuda, H. Resveratrol isolated from Polygonum cuspidatum root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. J Nutr 2001;131:1844-1849.

214. Wu, S.L.; Sun, Z.J.; Yu, L. y col. Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer. World J Gastroenterol 2004;10:3048-3052.

215. Fukui, M.; Yamabe, N.; Kang, K.S. y col. Growth-stimulatory effect of resveratrol in human cancer cells. Mol Carcinog 2010;49:750-759.

216. Gehm, B.D.; McAndrews, J.M.; Chien, P.Y. y col. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:14138-14143.

217. Bowers, J.L.; Tyulmenkov, V.V.; Jernigan, S.C. y col. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 2000;141:3657-3667.

218. Bhat, K.P.; Lantvit, D.; Christov, K. y col. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. Cancer Res 2001;61:7456-7463.

219. Boocock, D.J.; Faust, G.E.; Patel, K.R. y col. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16:1246-1252.

220. Williams, L.D.; Burdock, G.A.; Edwards, J.A. y col. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. Food Chem Toxicol 2009;47:2170-2182.

221. Faqi, A.S.; Schweinfurth, H. y Chahoud, I. Developmental toxicity of an octyltin stabilizer in NMRI mice. Reprod Toxicol 2001;15:117-122.

222. Isbrucker, R.A.; Edwards, J.A.; Wolz, E. y col. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 3: teratogenicity and reproductive toxicity studies in rats. Food Chem Toxicol 2006;44:651-661.

223. Ullmann, U.; Haller, J.; Decourt, J.P. y col. A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. J Int Med Res 2003;31:88-101.

224. Ullmann, U.; Haller, J.; Decourt, J.D. y col. Plasma-kinetic characteristics of purified and isolated green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) after 10 days repeated dosing in healthy volunteers. Int J Vitam Nutr Res 2004;74:269-278.

225. Crowell, J.A.; Korytko, P.J.; Morrissey, R.L. y col. Resveratrol-associated renal toxicity. Toxicol Sci 2004;82:614-619.

226. Surrey, E.S. y Halme, J. Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. Obstet Gynecol 1990;76:792-797.

227. Meresman, G.F.; Baranao, R.I.; Tenenbaum, A. y col. Effect of peritoneal fluid from patients with mild and severe endometriosis on endometrial stromal cell proliferation. Arch Gynecol Obstet 1997;259:109-115.