

## Efecto de los inhibidores de aromatasa en el crecimiento endometrial ectópico y en el medio peritoneal en un modelo murino de endometriosis

Mariela Bilotas, Ph.D.,<sup>a</sup> Gabriela Meresman, Ph.D.,<sup>a</sup> Inés Stella, M.D.,<sup>b</sup> Carlos Sueldo, M.D.,<sup>c</sup> y Rosa Inés Barañao, Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET; <sup>b</sup>Hospital Israelita; y <sup>c</sup>Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR), Buenos Aires, Argentina

**Objetivo:** Valorar los efectos de los inhibidores de aromatasa en los crecimientos endometriales ectópicos y en la liberación de factores angiogénicos e inflamatorios al líquido peritoneal (LP).

**Diseño:** Estudio experimental prospectivo.

**Entorno:** Institución para investigación en animales y laboratorio.

**Animales:** Hembras de ratones Balb/c de dos meses de edad.

**Intervenciones:** Se practicaron procedimientos quirúrgicos en los ratones para inducir lesiones de tipo endometriósico. Se inició tratamiento con anastrozol o letrozol en los días posoperatorios uno o 28 y se mantuvo durante cuatro semanas.

**Criterio principal de evaluación:** Cuenta y medición de las lesiones endometriósicas y valoración de expresión de aromatasa, proliferación celular y apoptosis. Se cuantificaron en LP el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y la prostaglandina E (PGE).

**Resultados:** Las lesiones de tipo endometriósico expresaron aromatasa P-450. El tratamiento con anastrozol o letrozol no evitó el desarrollo de las lesiones; sin embargo, sí causó disminución significativa del tamaño de éstas. Cuando se inició el tratamiento con letrozol y anastrozol al primer día posoperatorio, se redujo la proliferación celular y se incrementó la apoptosis; cuando se instituyó en el día 28, ambos inhibidores de aromatasa atenuaron la proliferación celular, pero sólo el anastrozol elevó los niveles de apoptosis. Además, el letrozol redujo las concentraciones de VEGF y PGE en el LP. Con el anastrozol disminuyó el contenido de VEGF, pero no se produjeron cambios significativos de la concentración de PGE.

**Conclusiones:** Estas observaciones fundamentan la necesidad de realizar otras investigaciones sobre la inhibición de la aromatasa como opción terapéutica para la endometriosis. (Fertil Steril® 2010;93:2513–8. ©2010 por la American Society for Reproductive Medicine.)

**Palabras clave:** Endometriosis, inhibidores de aromatasa, PGE, VEGF.

La endometriosis es un trastorno ginecológico frecuente y se caracteriza por la existencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, con dolor pélvico e infertilidad.<sup>1</sup>

Uno de los descubrimientos más recientes es el reconocimiento de que el endometrio ectópico expresa una concentración

elevada de aromatasa P-450.<sup>2,3</sup> Esta enzima es crucial para la biosíntesis de estrógeno (E), ya que cataliza la etapa limitante de su producción, la conversión de androstenediona (A) en estrona (E<sub>1</sub>) y la de testosterona (T) en estradiol (E<sub>2</sub>).<sup>4</sup> Además, se ha observado que la expresión de aromatasa es mayor en el endometrio eutópico de pacientes con endometriosis que en el de mujeres testigo.<sup>2,3,5-7</sup>

Bulun y colaboradores<sup>4</sup> demostraron que existe un vínculo entre la inflamación y la producción de E en casos de endometriosis. La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) es el más potente inductor de la expresión de aromatasa y su actividad *in vitro* en células tomadas de tejido endometriósico.<sup>8</sup> Asimismo, se ha demostrado que la E<sub>2</sub> induce la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la producción de PGE<sub>2</sub>.<sup>9</sup> Estos mecanismos incluyen un ciclo de

Recibido el 14 de abril de 2009; revisado y aceptado el 24 de agosto de 2009.

M.B., G.M., I.S., C.S. y R.I.B., no tienen ningún conflicto de intereses.

Financiado por ANPCYT (PICT 6384 BID 1201 OC-AR) y CONICET (PIP 5471), Buenos Aires, Argentina.

Solicitud de reimpresiones: Mariela Bilotas, Ph.D., Instituto de Biología y Medicina Experimental, Vuelta de Obligado 2490, C1428ADN Buenos Aires, Argentina (FAX: 54-11-47862564; correo electrónico: mabilotas@dna.uba.ar).

retroalimentación positiva que favorece la producción continua de  $E_2$  y  $PGE_2$  en lesiones endometriósicas.<sup>10</sup>

Además, se sabe que tanto la  $E_2$  como la  $PGE_2$  inducen la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y que, a su vez, éste induce la expresión de COX-2.<sup>11-13</sup> El factor de crecimiento endotelial vascular es uno de los más importantes en la patogenia de la endometriosis.<sup>14,15</sup> Se ha observado que la expresión del VEGF aumenta en el endometrio, eutópico y ectópico, de pacientes con endometriosis.<sup>16,17</sup> Más aún, la concentración del VEGF es significativamente más alta en el líquido peritoneal (LP) de estas mujeres.<sup>18</sup>

En la actualidad se utilizan inhibidores de aromatasa en el tratamiento coadyuvante y de primera línea en casos de cáncer de mama.<sup>19-21</sup> Takayama y colaboradores<sup>22</sup> fueron los primeros que informaron buenos resultados con el uso del inhibidor de aromatasa anastrozol en una paciente posmenopáusica que sufría endometriosis recurrente grave y que no había mejorado con los tratamientos convencionales. En fecha reciente, otros investigadores han empleado estos inhibidores para tratar casos de endometriosis.<sup>23-28</sup> En un estudio anterior, los autores del presente artículo observaron que los inhibidores de aromatasa letrozol y anastrozol inducen apoptosis y disminuyen la proliferación de células epiteliales endometriósicas en mujeres que padecen este trastorno.<sup>29</sup>

La finalidad del presente protocolo fue valorar, con base en los datos revisados, los efectos de los inhibidores de aromatasa letrozol y anastrozol sobre el establecimiento de la lesión, la proliferación celular y la apoptosis en el tejido endometrial ectópico y sobre la liberación de factores angiogénicos e inflamatorios en el LP de ratones hembra con endometriosis inducida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se usaron hembras de ratón Balb/c. Se cuidó a todos los animales, según lo establecido en la guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio de los *National Institutes of Health*.

### Cirugía

Al momento de la operación, todos los ratones tenían dos meses de edad. Se indujeron lesiones de tipo endometriósico por medio del trasplante de cuernos uterinos al mesenterio intestinal, como se describió con anterioridad.<sup>30</sup> En resumen, se trasplantaron partes iguales de tejido uterino del lado derecho que medían alrededor de 4 mm<sup>2</sup>, las cuales se suturaron a la capa serosa, en aposición directa al peritoneo, junto a un vaso de la capa endometrial del cuadro uterino que se halla frente a la serosa. Se aplicó una sola sutura (supralong 6-0) a cada pieza de tejido.

### Tratamiento en los animales

Se realizó una distribución al azar de los animales entre grupos experimentales de 12 individuos cada uno. De forma inicial se

separó a los ratones en tres grupos: anastrozol, letrozol y testigos. A todos se les aplicó una inyección subcutánea diaria de 10 µg (0.5 mg/kg) de anastrozol, letrozol o solución salina, según fuera el grupo. Todos los tratamientos duraron cuatro semanas y se efectuó una revisión diaria en cada ratón. No se identificaron signos de toxicidad con las dosis administradas, de acuerdo con el peso corporal, consumo de alimentos, acicalamiento o grados de actividad, en comparación con los animales testigo. Se inició el tratamiento el primer día del posoperatorio para determinar los efectos de los inhibidores de aromatasa en el establecimiento y la progresión de la enfermedad. En los estudios para cuantificar dichos efectos sobre lesiones ya establecidas se dirigió la administración de inhibidores de aromatasa hasta el día 28 y se prolongó el tratamiento durante cuatro semanas.

### Valoración del tejido uterino ectópico

Después de cuatro semanas de tratamiento, se sacrificó a los animales por luxación cervical. Se identificaron y contaron las lesiones para luego medirlas en diámetros perpendiculares por medio de un calibrador. Se calculó el volumen de cada uno de los tejidos uterinos ectópicos mediante la fórmula  $V = (4/3) \pi r_1^2 r_2$ , donde  $r_1$  y  $r_2$  representan los radios y  $r_1 < r_2$ .<sup>31</sup> A continuación se resecaron las lesiones, el cuerno uterino izquierdo y ambos ovarios y se fijaron en un amortiguador de formaldehído al 10%; las partes extirpadas fueron imbuidas en parafina, para cortarlas en secciones de 5 µm y teñirlas con hematoxilina y eosina (H y E). Se examinaron las secciones al microscopio en busca de signos histológicos de endometriosis.

### Inmunohistoquímica

Se realizó la tinción inmunohistoquímica como ya se indicó<sup>32</sup> y se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: un antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) contra ratón, un anticuerpo policlonal de conejo (1:300, FL-261; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) y un anticuerpo policlonal de conejo contra aromatasa murina (en dilución de 1:2 000, producido por el Dr. I. Azcoitia, de Madrid, España) generado a partir de un péptido de 15 aminoácidos correspondientes a los residuos 488 a 502 de la aromatasa murina.<sup>33</sup> Se utilizó como control negativo una inmunoglobulina de la misma clase y concentración que la del anticuerpo primario empleado.

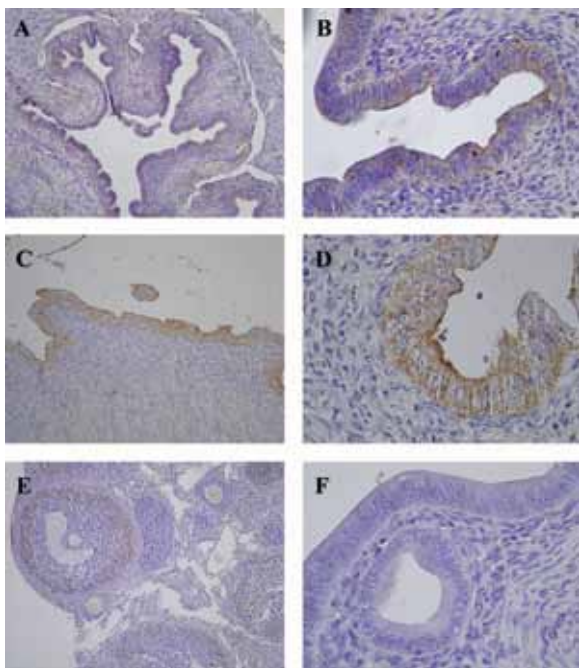
El porcentaje de células que expresaban reacciones inmunitarias a PCNA (índice de PCNA) se determinó mediante conteos con microscopio óptico realizados por dos observadores diferentes. Se contó el número total de células en 10 campos representativos y se consideró que cada tinción nuclear era un signo positivo.

### Sistema para detectar apoptosis

Para efectuar la cuantificación de la apoptosis se procesaron secciones de tejido ectópico, con objeto de realizar una localización inmunocitoquímica *in situ* de los núcleos con ADN fragmentado. Para ello se usó la técnica de marcar el extremo fragmentado con digoxigenina dUTP, con mediación de desoxinucleotidiltransferasa terminal (método conocido como TUNEL,

**FIGURA 1**

Expresión de aromatasa en lesiones de tipo endometriósico. Se resecaron dichas lesiones de ratones testigo, se fijaron con formalina, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Se valoró la expresión de la aromatasa por medios inmunohistoquímicos con anticuerpos policlonales. Se observaron casos de expresión de aromatasa, leve (**A y B**) e intensa (**C y D**), en el endometrio ectópico de ratones. Se utilizaron secciones de ovario murino como control positivo (**E**) e inmunoglobulina primaria empleado como control negativo (**F**). Amplificación, 100x (**A, C y E**) y 400x (**B, D y F**).



*Bilotas. Aromatase inhibitors and endometriosis. Fertil Steril 2010.*

por sus siglas en inglés), y un equipo de detección de apoptosis (Chemicon International, Temecula, CA). Como ya se indicó, se trataron las muestras de acuerdo con las instrucciones del fabricante.<sup>32</sup> Tres a cinco días después del destete de las crías se cortaron secciones de glándula mamaria de las hembras de estos roedores para utilizarlas como control positivo. Para el control negativo se trataron varias muestras de tejido sin desoxinucleotidiltransferasa. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas por conteo de células marcadas, con aumentos de imagen de 400x, en 30 campos homogéneos seleccionados al azar.

Además, se identificaron las células apoptóticas por sus características morfológicas distintivas en secciones de endometrio teñidas con H y E.<sup>32</sup>

### Cuantificación del VEGF

Tras cuatro semanas de tratamiento se sacrificó a los animales mediante luxación cervical. Se recolectó el líquido peritoneal

por lavado de la cavidad abdominal con 1 mL de solución salina y se aplicó la prueba comercial ELISA kit (MMV00, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) para detectar VEGF. El grado de sensibilidad de la prueba ELISA para VEGF fue de 3 pg/mL. La variabilidad entre mediciones de distintas muestras de VEGF fue de  $\pm 4.3\%$ , mientras que la variabilidad en las mediciones de una misma muestra fue de  $\pm 5.7\%$ . Se analizaron todas las muestras por triplicado.

### Radioinmunoanálisis para PGE

Se llevó a cabo la valoración de las concentraciones de PGE por radioinmunoanálisis (RIA), como se mencionó con anterioridad.<sup>34</sup> Descrito en forma sinóptica, se acidificó el líquido peritoneal a un pH de 3.0, con 1 M de HCl y, para determinar el contenido de etilo, se prepararon tres extractos con un volumen de acetato de etilo. Se desecó el conjunto de estos extractos en una atmósfera de  $N_2$  y se almacenó a  $-20^\circ C$ , hasta que se realizó el RIA de prostaglandinas. Se cuantificaron las concentraciones de PGE con antisuero de conejo, producido por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La sensibilidad fue de 10 pg/tubo de ensayo y la reactividad cruzada fue  $< 0.1\%$  con otras prostaglandinas. Se expresaron los resultados en picogramos por mililitro (pg/mL).

### Análisis estadístico

Se efectuaron comparaciones estadísticas por medio de análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn. Se consideró que sólo los valores de  $p \leq 0.05$  eran significativos, sin importar cuál fuera la prueba estadística aplicada.

## RESULTADOS

### Expresión de aromatasa en endometrio ectópico de ratón

Se valoró la expresión de aromatasa por análisis inmunohistoquímico en lesiones de tipo endometriósico en los ratones testigo. Se detectó aromatasa en 64% de las lesiones analizadas ( $n = 22$ ). Se realizó inmunolocalización de aromatasa en el citoplasma de células glandulares (**Figura 1A-D**). No se detectaron reacciones inmunitarias en el estroma y se observaron distintos grados de expresión de aromatasa: bajos en 57% de las lesiones positivas (**Figura 1A, B**) y altos en 43% de las lesiones positivas (**Figura 1C, D**).

### Efectos de los inhibidores de aromatasa en el crecimiento del tejido uterino ectópico

Se valoraron en dos etapas los efectos del anastrozol y el letrozol sobre lesiones endometriósicas: [1] en el establecimiento de la lesión (con inicio del tratamiento en el primer día posoperatorio) y [2] en lesiones ya establecidas (con inicio del tratamiento en el día 28 después de la operación). En todos los grupos se registró el

mismo porcentaje de ratones que desarrollaron lesiones y el número de lesiones por ratón fue similar (no se muestran los datos) en todos los grupos. Sin embargo, tanto el anastrozol como el letrozol redujeron el tamaño de las lesiones de tipo endometriósico, en comparación con las del grupo testigo, cuyo tratamiento inició el primer día posoperatorio ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) (Figura 2A), y las observadas cuando el tratamiento se inició el día 28 después de la operación ( $p < 0.05$ , respecto de los ratones testigo) (Figura 2B).

### Efecto de los inhibidores de aromatasa en la proliferación de células epiteliales y en la apoptosis del tejido uterino ectópico

El tratamiento con estos inhibidores atenuó la proliferación de células epiteliales e incrementó el índice apoptótico, en comparación con lo observado en el grupo testigo (Figura 3). Cuando se inició el tratamiento en el primer día posoperatorio, el porcentaje de células PCNA positivas disminuyó si el fármaco administrado fue anastrozol ( $p < 0.001$  comparado con los testigos) y letrozol ( $p < 0.01$  respecto de los testigos) (Figura 3A). Además, el porcentaje de células epiteliales apoptóticas aumentó en las lesiones de roedores tratados con anastrozol ( $p < 0.05$ , en relación con los testigos) y en las lesiones de animales tratados con letrozol ( $p < 0.01$  en comparación con los testigos) (Figura 3B).

Resultados similares se identificaron cuando el tratamiento se instituyó en el día posoperatorio 28. El porcentaje de células positivas a PCNA decreció en los grupos tratados con anastrozol y letrozol respecto de los testigos ( $p < 0.01$ ) (Figura 3A). Más aún, el porcentaje de células epiteliales apoptóticas aumentó luego del tratamiento con anastrozol ( $p < 0.05$  respecto del testigo) (Figura 3B). La administración de letrozol también generó elevación del porcentaje de células apoptóticas, pero no de manera estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ , en comparación con los testigos) (Figura 3B).

### Efecto de los inhibidores de aromatasa sobre las concentraciones de VEGF y PGE en LP

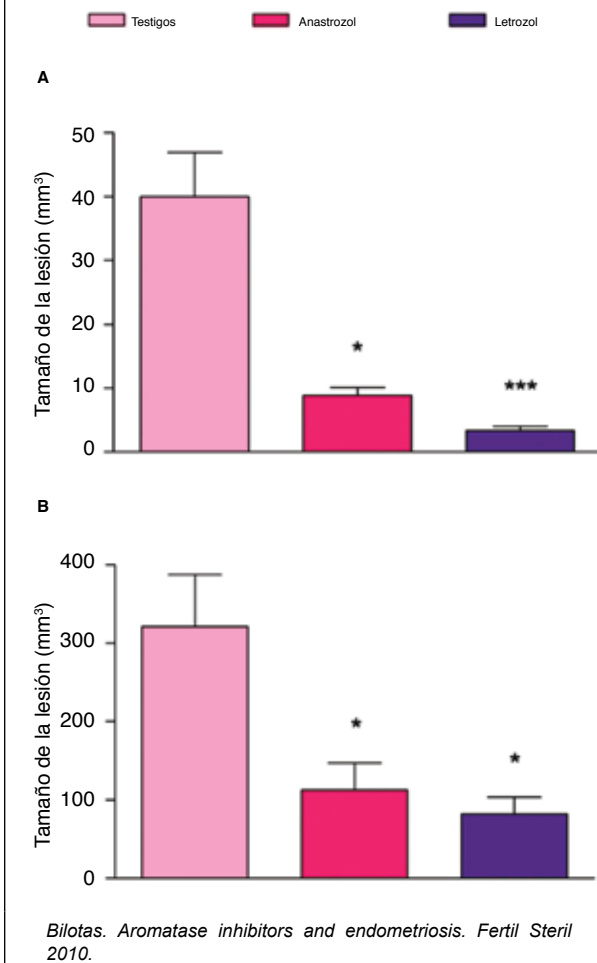
Al iniciar el tratamiento con anastrozol o letrozol el día 28 después de la operación, disminuyeron las concentraciones de VEGF en el LP ( $p < 0.05$ , en comparación con los testigos) (Figura 4A). Al instituir el tratamiento con letrozol hasta ese día, la concentración de PGE decreció respecto de la correspondiente del grupo testigo ( $p < 0.001$ ) (Figura 4B); sin embargo, con el anastrozol se reconocieron cambios no significativos en la concentración de dicha prostaglandina ( $p > 0.05$  en relación con los testigos) (Figura 4B).

## DISCUSIÓN

En la presente investigación se valoraron los efectos del anastrozol y letrozol en el establecimiento de lesiones endometriósicas y lesiones ya establecidas, en un modelo murino de endometriosis. Los autores del artículo observaron que el anastrozol y el letrozol

**FIGURA 2**

Efecto de los inhibidores de aromatasa en el tamaño de las lesiones endometriósicas. Se indujo endometriosis por medios quirúrgicos a ratones y se trató con anastrozol, letrozol o solución salina (testigos), a partir de los días posoperatorios 1 (A) o 28 (B). Tras cuatro semanas de tratamiento, se sacrificó a los animales y se midieron las lesiones endometriósicas. \* $p < 0.05$  comparado con los testigos; \*\*\* $p < 0.001$  respecto de los testigos.

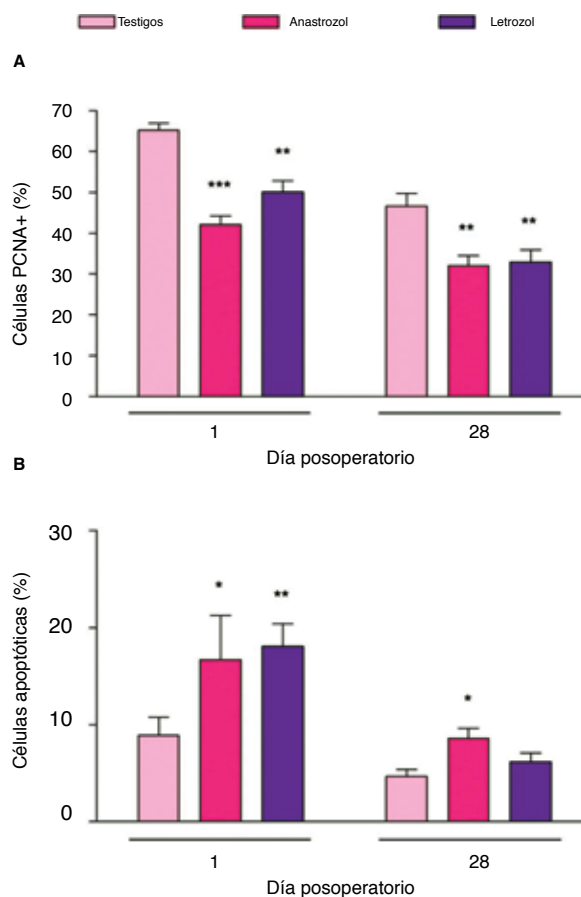


no evitan la aparición de tales lesiones, pero sí propician una disminución significativa de su tamaño. Estos resultados son consistentes con los de Fang y colaboradores,<sup>30</sup> quienes demostraron que el letrozol contrajo el tamaño de las lesiones endometriósicas en un modelo murino de endometriosis. De igual manera, los inhibidores de aromatasa aliviaron los síntomas de dolor y redujeron el tamaño de las lesiones en pacientes con endometriosis.<sup>22-28</sup>

En este estudio se advirtió que las anomalías endometriósicas en diversas etapas de su desarrollo (durante y después de su aparición) respondieron de manera similar al tratamiento con inhibidores de aromatasa; también se demostró que el anastrozol y el letrozol atenúan la proliferación celular en la fracción

**FIGURA 3**

Efecto de los inhibidores de aromatasa sobre la proliferación de células epiteliales (PCNA+) (A) y la apoptosis (B) en tejido uterino ectópico. Se indujo endometriosis por medios quirúrgicos a ratones y se trató con anastrozol, letrozol o solución salina (testigos), a partir de los días posoperatorios 1 (A) o 28 (B). Luego de cuatro semanas de tratamiento se sacrificó a los ratones y se resecaron las lesiones de tipo endometriósico, que a continuación se fijaron con formalina, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones. Se valoró la proliferación celular (A) por pruebas inmunohistoquímicas para detectar PCNA y se valoró la apoptosis (B) mediante marcaje del extremo fragmentado con digoxigenina dUTP, con mediación de desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL). \* $p < 0.05$  comparado con los testigos; \*\* $p < 0.01$  respecto de los testigos; \*\*\* $p < 0.001$  en comparación con los testigos.

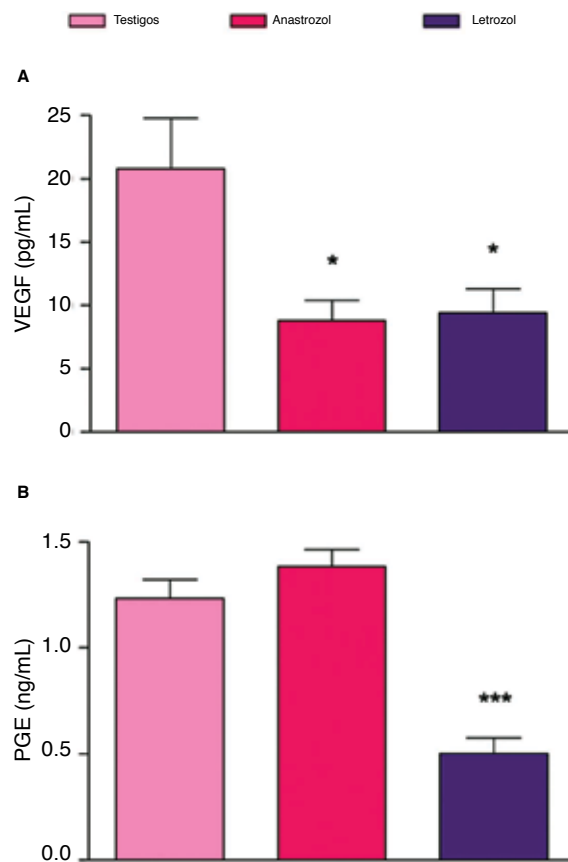


Bilotas. Aromatase inhibitors and endometriosis. *Fertil Steril* 2010.

epitelial de las lesiones endometriósicas, en las dos etapas de su desarrollo. Además, con ambos diseños del experimento se identificó que el anastrozol elevaba el grado de apoptosis en dichas células. El letrozol produjo un aumento de la apoptosis en la fracción epitelial de las lesiones endometriósicas, con ambos diseños del experimento, pero el efecto sólo tuvo relevancia estadística cuando el tratamiento se inició el primer día posoperatorio. Están disponibles estudios sobre los efectos antiproliferativos

**FIGURA 4**

Efecto de los inhibidores de aromatasa en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (A) y en la concentración de prostaglandina E (PGE) (B) en líquido peritoneal (LP). Se indujo endometriosis por medios quirúrgicos a ratones y se trató con anastrozol, letrozol o solución salina (testigos), a partir del día posoperatorio 28. Después de cuatro semanas de tratamiento se sacrificó a los ratones y se recolectó el LP. Las concentraciones de VEGF (A) se determinaron por ELISA y las de PGE (B) por RIA. \* $p < 0.05$  comparado con testigos; \*\*\* $p < 0.001$  respecto de los testigos.



Bilotas. Aromatase inhibitors and endometriosis. *Fertil Steril* 2010.

y proapopticos de los inhibidores de aromatasa, *in vitro* e *in vivo*, y se ha demostrado que el tratamiento con letrozol reduce la proliferación celular en las lesiones endometriósicas en modelos murinos de endometriosis.<sup>30</sup> De forma adicional, se observó que el letrozol disminuye la proliferación celular e incrementa la apoptosis en modelos de cáncer mamario.<sup>35,36</sup> Dowsett y colaboradores<sup>37</sup> comprobaron que el tratamiento con anastrozol aminora la proliferación de células en tumores de cáncer mamario, pero no causa efecto en la apoptosis. Más aún, en un protocolo anterior realizado en el laboratorio de los autores del artículo, se advirtió que la administración terapéutica de anastrozol y letrozol atenúa la proliferación celular e incrementaba *in vitro* la apoptosis en células del epitelio endometrial en pacientes con endometriosis.<sup>29</sup> Otros investigadores han observado efectos *in*



*in vitro* similares en células de liomomas uterinos y células epiteliales tumorales de cáncer mamario.<sup>36,38</sup>

Los resultados del presente estudio demuestran que los tratamientos con anastrozol y letrozol reducen la concentración del VEGF en el LP de ratones hembra con endometriosis inducida por medios quirúrgicos. No obstante, aunque el letrozol ha generado esta disminución, el tratamiento con anastrozol no indujo efectos significativos. En concordancia con estos resultados, Bottini y colaboradores<sup>39</sup> detectaron que el letrozol atenúa la expresión de VEGF en sujetos con cáncer de mama. Además, Weems y colaboradores<sup>40</sup> demostraron que la administración terapéutica de un inhibidor de aromatasa provocaba la disminución de las concentraciones plasmáticas de PGE<sub>2</sub> en hembras de oveja preñadas y ovariectomizadas.

Como ya se mencionó, los autores del presente artículo identificaron que el letrozol reduce la concentración de PGE en LP, en tanto que el anastrozol carecía de efectos significativos. Otros investigadores han reconocido efectos distintos de estos dos fármacos, pero el letrozol parece más potente que el anastrozol, *in vivo* e *in vitro*.<sup>41</sup> También se demostró que el primero es más eficaz para inducir regresión tumoral y suprimir la concentración sérica de E, además de inhibir la aromatización.<sup>31,41</sup> Es posible que las diferencias entre letrozol y anastrozol se relacionen con sus distintos procesos farmacocinéticos y con los efectos sobre las concentraciones de lípidos y la adrenoesteroidogénesis.<sup>42</sup>

En esta investigación, los autores administraron dosis diarias de letrozol y anastrozol mayores que las utilizadas normalmente en el tratamiento de la endometriosis,<sup>24,26</sup> pero similares a las que suministraron otros investigadores en modelos murinos de endometriosis y en modelos de cáncer mamario en ratones lampiños.<sup>30,31,43</sup> Además, es necesario tomar en cuenta que en este protocolo se aplicaron anastrozol y letrozol solos. Siempre se combina la administración de inhibidores de aromatasa para el tratamiento de la endometriosis en mujeres premenopáusicas con otros agentes para suprimir la función hipofisaria.<sup>25-28</sup>

En el presente estudio, los investigadores demostraron que las lesiones de tipo endometriósicas expresan aromatasa en este modelo murino del trastorno. Se detectaron las reacciones inmunitarias contra aromatasa sólo en glándulas y no en el estroma. Otros especialistas observaron este patrón de expresión de aromatasa en el endometrio ectópico humano.<sup>3,7</sup> Sin embargo, Matsuzaki y colaboradores<sup>5</sup> han identificado la expresión de aromatasa en las fracciones glandular y estromática de lesiones endometriósicas en mujeres.

Los autores de este artículo no han analizado la función de la expresión local de aromatasa en este modelo, ya que no emplearon ratones ovariectomizados, para simular la endometriosis en mujeres premenopáusicas. Aunque no se puede descartar el efecto local de los inhibidores de aromatasa en lesiones endometriósicas, se requieren otros estudios para demostrarlo.

En suma, los resultados de esta investigación indican que los inhibidores de aromatasa producen un efecto benéfico contra el crecimiento de lesiones endometriósicas. El tratamiento con estos compuestos reduce el tamaño de tales lesiones al atenuar la proliferación celular e incrementar el grado de apoptosis. Asimismo, la administración terapéutica de inhibidores de aromatasa normaliza las concentraciones de factores angiogénicos e inflamatorios en el medio peritoneal. Estos datos fundamentan

la necesidad de realizar mayores investigaciones acerca de la inhibición de aromatasa como opción terapéutica contra la endometriosis.

**Reconocimiento:** Los autores agradecen la asistencia técnica especializada de la Dra. Alicia Motta en la determinación de las concentraciones de PGE y al Dr. García-Segura por la facilitación de los anticuerpos contra aromatasa utilizados en este trabajo.

## REFERENCIAS

1. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789–99.
2. Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:174–9.
3. Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, et al. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 1997;57:514–9.
4. Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J, et al. Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;79:19–25.
5. Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Dechelotte PJ, Mage G. Analysis of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression in deep endometriosis and eutopic endometrium using laser capture microdissection. *Fertil Steril* 2006;85:308–13.
6. Kyama CM, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mwenda JM, Mathieu C, et al. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2008;89:301–10.
7. Hudelist G, Czerwenka K, Keckstein J, Haas C, Fink-Retter A, Gschwandler-Kaulich D, et al. Expression of aromatase and estrogen sulfotransferase in eutopic and ectopic endometrium: evidence for unbalanced estradiol production in endometriosis. *Reprod Sci* 2007;14:798–805.
8. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:600–6.
9. Tamura M, Deb S, Sebastian S, Okamura K, Bulun SE. Estrogen up-regulates cyclooxygenase-2 via estrogen receptor in human uterine microvascular endothelial cells. *Fertil Steril* 2004;81:1351–6.
10. Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* 2006;12:49–56.
11. Albrecht ED, Babischkin JS, Lidor Y, Anderson LD, Udoff LC, Pepe GJ. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 2003;18:2039–47.
12. Tamura K, Sakurai T, Kogo H. Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 2006;44:411–6.
13. Tamura M, Sebastian S, Gurates B, Yang S, Fang Z, Bulun SE. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3504–7.
14. Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grummer R. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005;8:147–56.
15. Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod* 2000;6:269–75.
16. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. 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;132:501–9.
17. Takehara M, Ueda M, Yamashita Y, Terai Y, Hung YC, Ueki M. Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis. *Hum Pathol* 2004;35:1369–75.
18. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11:220–3.
19. Graham PH. Anastrozole for malignant and benign conditions: present applications and future therapeutic integrations. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:2347–57.
20. Goss PE. Breast cancer prevention—clinical trials strategies involving aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86:487–93.

21. Santen RJ, Harvey HA. Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocrinol Relat Cancer* 1999;6:75–92.
22. Takayama K, Zeitoun K, Gunby RT, Sasano H, Carr BR, Bulun SE. Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 1998;69:709–13.
23. Mousa NA, Bedaiwy MA, Casper RF. Aromatase inhibitors in the treatment of severe endometriosis. *Obstet Gynecol* 2007;109:1421–3.
24. Hefler LA, Grimm C, van Trotsenburg M, Nagele F. Role of the vaginally administered aromatase inhibitor anastrozole in women with rectovaginal endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2005;84:1033–6.
25. Remorgida V, Abbamonte HL, Ragni N, Fulcheri E, Ferrero S. Letrozole and norethisterone acetate in rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 2007;88:724–6.
26. Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, Bulun SE. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004;81:290–6.
27. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84:300–4.
28. Remorgida V, Abbamonte LH, Ragni N, Fulcheri E, Ferrero S. Letrozole and desogestrel-only contraceptive pill for the treatment of stage IV endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2007;47:222–5.
29. Meresman GF, Bilotas M, Abello V, Buquet R, Tesone M, Sueldo C. Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84:459–63.
30. Fang Z, Yang S, Gurates B, Tamura M, Simpson E, Evans D, et al. Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3460–6.
31. Brodie A, Jelovac D, Long BJ. Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. *Clin Cancer Res* 2003;9:455S–9S.
32. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000;74:760–6.
33. Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 1999;89:567–78.
34. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, Di GG, et al. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol* 2004;64:59–74.
35. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Tao Y, Llombart-Cussac A, Janicke F, et al. Letrozole inhibits tumor proliferation more effectively than tamoxifen independent of HER1/2 expression status. *Cancer Res* 2003;63:6523–31.
36. Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003;63:8037–50.
37. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, et al. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1024–1030s.
38. Han M, Kim JY, Prk JE, Kim JM, Lee KS. Effects of letrozole on proliferation and apoptosis in cultured leiomyoma cells treated with prostaglandin E(2). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;138:83–8.
39. Bottini A, Generali D, Brizzi MP, Fox SB, Bersiga A, Bonardi S, et al. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:3623–8.
40. Weems YS, Bridges PJ, LeaMaster BR, Sasser RG, Ching L, Weems CW. Effect of the aromatase inhibitor CGS-16949A on pregnancy and secretion of progesterone, estradiol-17beta, prostaglandins E and F2alpha (PGE; PGF2alpha) and pregnancy specific protein B (PSPB) in 90-day ovariectomized pregnant ewes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001;66:77–88.
41. Haynes BP, Dowsett M, Miller WR, Dixon JM, Bhatnagar AS. The pharmacology of letrozole. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;87:35–45.
42. Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. *Cancer* 2002;95:2006–16.
43. Lu Q, Yue W, Wang J, Liu Y, Long B, Brodie A. The effects of aromatase inhibitors and antiestrogens in the nude mouse model. *Breast Cancer Res Treat* 1998;50:63–71.