

Apoptosis y su impacto en la reproducción femenina

Dra. Gabriela Meresman

Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET

Resumen

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso genéticamente controlado mediante el cual las células inducen su propia muerte. Este proceso fisiológico contribuye a la construcción y al mantenimiento de los tejidos y participa a lo largo de la vida de un individuo, desde el desarrollo hasta la senescencia.

Mensualmente y en forma cíclica, el ovario, el endometrio y la glándula mamaria atraviesan por ciclos de proliferación celular y apoptosis, respondiendo a los cambios en la secreción hormonal. La regulación de estos ciclos de crecimiento y muerte juega un rol importante, no sólo en la fisiología de los tejidos, sino también en la prevención de transformación neoplásica e inicio del cáncer.

Durante el desarrollo embrionario, la apoptosis está implicada en procesos relacionados con la escultura de los diferentes órganos, con la eliminación de estructuras innecesarias en algún estadio de la evolución y con el control de las células defectuosas. Durante las etapas de desarrollo temprano, se eliminan por apoptosis células anormales, con localización errónea, no funcionales o potencialmente peligrosas.

Asimismo, la muerte celular programada juega un rol fundamental en el desarrollo y en la funcionalidad del ovario. En los seres humanos, la reserva folicular se establece durante la vida fetal y luego se va eliminando gradualmente. La apoptosis está involucrada tanto en la muerte celular durante el proceso de reclutamiento del folículo dominante, como en la luteólisis.

Durante la pubertad la apoptosis contribuye a la formación del espacio luminal de los ductos terminales de la mama. Asimismo, durante cada ciclo menstrual la glándula mamaria adulta está expuesta a fluctuaciones hormonales periódicas que resultan en ciclos de proliferación, diferenciación y muerte celular, en los cuales está involucrada la apoptosis. A su vez, el proceso de involución mamaria luego del período de lactancia, se caracteriza por una apoptosis masiva de las células epiteliales secretorias y por una remodelación estructural de la mama.

Así como la apoptosis está involucrada en los cambios en el tejido endometrial que ocurren a nivel fisiológico, se ha asociado a la muerte celular programada con procesos patológicos, más que nada en aquellos caracterizados por el incremento en el crecimiento celular como es el caso de la endometriosis.

En síntesis, la muerte celular programada es un evento sumamente complejo y finamente regulado, que está involucrado tanto en la fisiología como en la patología del sistema reproductor femenino. El delicado balance entre la apoptosis y la proliferación celular es fundamental, ya que permite que los tejidos puedan responder en forma cíclica a los cambios hormonales que acontecen en la vida reproductiva de las mujeres. Por otro lado, se han detectado defectos en los niveles de apoptosis en ciertas patologías de tejidos reproductivos como en la endometriosis, donde la investigación básica está aportando nuevos fundamentos para utilizarlos en la búsqueda de alternativas terapéuticas más eficientes.

Abstract

Apoptosis is an evolutionarily conserved form of cell death that maintains normal cellular homeostasis in adult organisms. Apoptotic cell death plays multiple roles during embryonic and organ development. It is involved in sculpturing tissues; it serves to delete structures that are no longer required; it ensures tissue homeostasis by counteracting the proliferative processes involved in tissue renewal and it is involved in the destruction of potentially harmful cells.

Due to the cyclic nature of female reproductive system imposed by the release of ovarian steroids, female reproductive organs such as the ovary, endometrium and mammary gland sustain continuous cycles of cell growth and apoptosis in response to hormonal changes. These cycles of cell growth/death, also known as "tissue remodeling" play an important role not only in the normal physiology of the tissue but also in the prevention of neoplastic transformation and cancer formation.

In the ovary, apoptosis has been found to occur in three different cell types: oocytes, granulosa cells and

luteal cells. The oocyte apoptosis is most intense during embryonal development. During folliculogenesis, apoptosis has been mainly observed in the granulosa cells of the growing ovaries. It is likely that follicular atresia of unselected follicles is primarily caused by granulosa cell apoptosis and this process seems to be principally controlled by hormones. Also, there is accumulating evidence that apoptosis plays part in corpus luteum regression.

As a female reproductive organ, the uterus is characterized by continuous cycles of endometrial cell growth and degeneration in response to hormonal changes. Accumulated evidence suggest that apoptosis helps to maintain cellular homeostasis during the menstrual cycle by eliminating senescent cells from the functional layer of the uterine endometrium during the late secretory and menstrual phase of the cycle. In endometriosis women, the eutopic endometrium has some fundamental differences compared with normal endometrium. The differences could contribute to the survival of regurgitating endometrial cells into the peritoneal cavity and the development of endometriosis. One mechanism that recently gained a lot of interest is the finding that apoptosis is decreased in eutopic and ectopic endometrium of patients with endometriosis.

In addition, it has been shown that apoptosis plays important roles in the mammary gland development and function, and its impairment has been speculated to promote breast cancer. Programmed cell death has an important role in embryonic and ductal mammary development and in epithelial homeostasis during menstrual cycles. During pregnancy extensive proliferation and cellular differentiation takes place within the mammary epithelium. After cessation of lactation, this secretory epithelium regresses in a process termed involution which is characterized by the massive apoptosis of secretory epithelial cells and by structural remodeling. By this means, apoptosis is involved in the deletion of structures that are no longer required and thus returns the mammary gland to the pre-pregnant state.

Regulation of apoptosis in reproductive organs has been studied extensively. The aim of this work was to review the role of apoptosis and its regulatory mechanism in the human female reproductive system. As well, the role of apoptosis in the treatment of endometriosis is reviewed to link the basic research findings into clinical applications.

Introducción

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso genéticamente controlado mediante el cual las células inducen su propia muerte. De ahí que a la hora de definirlo conceptualmente, frecuentemente se

describa el proceso apoptótico como “suicidio celular”. Este evento puede ser desencadenado tanto por estímulos extrínsecos como intrínsecos, es propio de los organismos multicelulares desde los parásitos hasta los seres humanos, y conduce a la eliminación de células que se producen en exceso, que se han desarrollado en forma impropia o que acarrearán algún daño genético¹. La muerte celular programada es un proceso fisiológico que contribuye a la construcción y al mantenimiento de los tejidos. A lo largo de la vida de un organismo, participa desde el desarrollo hasta la senescencia. El delicado equilibrio entre proliferación celular y apoptosis asegura un correcto control sobre la homeostasis de los tejidos. Sin embargo, una falla en ese balance dada tanto por niveles de apoptosis aumentados como disminuidos puede disparar procesos patológicos tales como el cáncer, sida o autoinmunidad². En los últimos años, el proceso de apoptosis ha suscitado el interés de numerosos investigadores y ha sido blanco de diversas investigaciones que se vieron reflejadas en más de 155,000 publicaciones científicas hasta la actualidad (fuente: PubMed, NCBI, Octubre de 2008).

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

En esta puesta al día resumiré los aspectos más relevantes de la implicancia de la apoptosis en la fisiopatología del aparato reproductor femenino y en el desarrollo del embrión en sus primeras etapas.

Apoptosis: aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares

A la hora de deshacerse de células potencialmente riesgosas o simplemente que están en exceso, los organismos multicelulares ponen en marcha la maquinaria de apoptosis. Ésta consiste en un proceso activo y genéticamente controlado que culmina con la destrucción de la célula. La apoptosis es un proceso altamente complejo que involucra una secuencia de señalización intracelular a través de diversas proteínas y factores regulatorios, algunos inhibitorios y otros inductores de la muerte. En este apartado, resumiré los aspectos más relevantes de este proceso, limitándome a nombrar sólo las

vías de regulación más destacadas con el consiguiente riesgo de simplificar lo complejo.

La ejecución del programa de muerte se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos, que incluyen entre otros la contracción celular, la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de vesículas rodeadas de membrana con organelas intactas, llamadas cuerpos apoptóticos³ (Figura 1). Es importante destacar que la membrana de las células apoptóticas permanece intacta hasta las últimas etapas, sin liberar el contenido citoplasmático y, por consiguiente, sin generar inflamación local.

Estos cambios se producen como consecuencia de la activación de dos grandes y complejas vías de señalización intracelular: la vía extrínseca, mediada por receptores, y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas convergen en unas proteínas efectoras características llamadas caspasas, y culminan en la destrucción programada de la célula⁴. Luego, las células apoptóticas son rápidamente eliminadas por el sistema inmune sin mediar procesos inflamatorios.

Las caspasas forman una familia de proteasas homólogas entre sí y altamente conservadas en la evolución. Son cisteína proteasas específicas de ácido aspártico. Las caspasas se expresan como proenzimas sin actividad biológica, y tienen que activarse para poder ejercer su acción. Estas procaspasas poseen la habilidad de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación. Participan

tanto de la iniciación como de la ejecución del proceso de apoptosis. En las etapas finales de la apoptosis, la ruptura controlada del ADN es llevada a cabo por una endonucleasa que se activa vía caspasas⁵.

La vía extrínseca o vía de receptores involucra a la familia de receptores y ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF) entre los cuales se encuentra Fas o CD95, el miembro de los receptores de muerte más estudiado y relevante. La unión de Fas con su ligando FasL (o CD95L) es requerida para la transducción de la señal apoptótica. Luego de este evento, una serie de proteínas intracelulares se asocia con el Fas activado, formándose el complejo de señalización inductor de muerte (death-inducing signalling complex, DISC). Primero, la molécula adaptadora FADD (Fas-associated death domain) se une a través de su dominio de muerte al Fas y luego, este complejo recluta a la procaspasa-8. Esta unión da lugar a la proteólisis de la procaspasa-8 que es activada y liberada del DISC al citoplasma. La caspasa-8 activa inicia la denominada cascada de caspasas, procesando a la procaspasa-3, que resulta en su activación y otorga la señal a endonucleasas para la ejecución de la muerte celular⁶ (Figura 2).

Por otro lado, la vía intrínseca de señalización intracelular disparada por eventos tales como daño al ADN por tóxicos o por radiación, es también denominada vía mitocondrial. La mitocondria es fundamental en el proceso de apoptosis ya que una gran variedad de eventos claves están focalizados en esta organela. La mayoría de los mecanismos apoptóticos que tienen lugar en la mitocondria están regulados por el equilibrio entre los

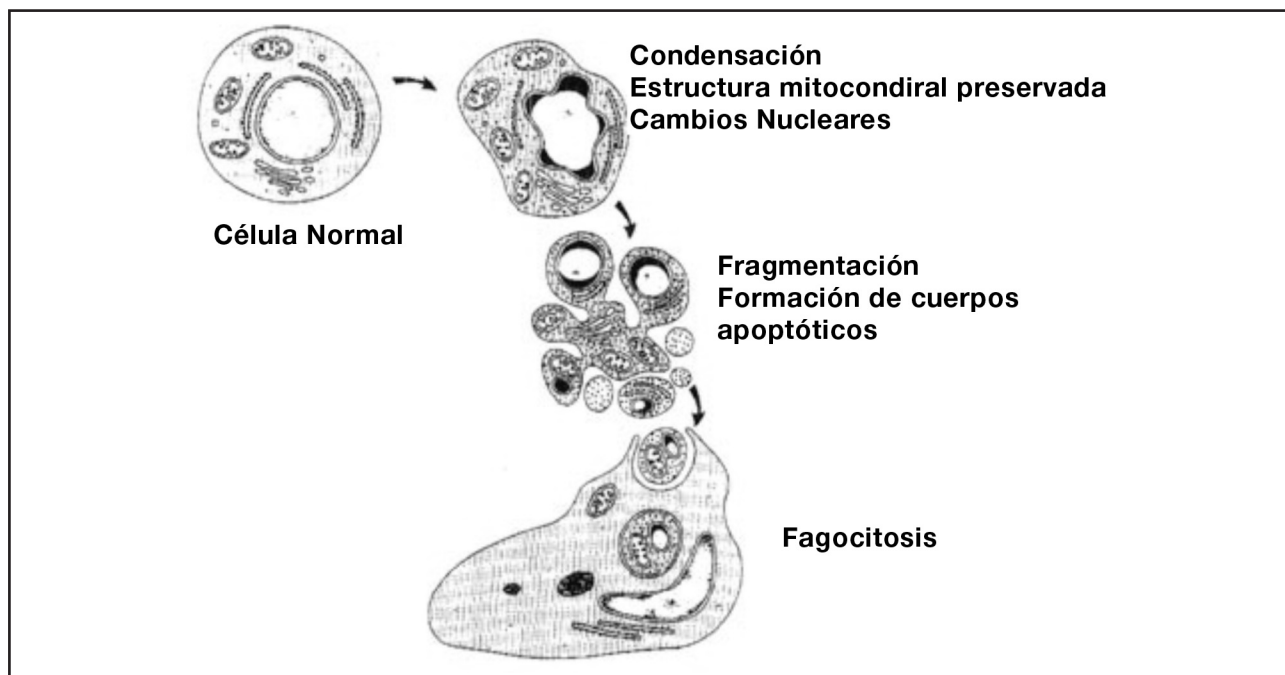


Figura 1: Cambios estructurales de la célula que ocurren durante la apoptosis.

miembros de la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas y el citocromo-c son los componentes más importantes involucrados en la vía mitocondrial. La familia de Bcl-2 consta de 19 miembros, algunos de los cuales poseen actividad anti-apoptótica como el Bcl-2 y Bcl-XL y otros, con actividad pro-apoptótica, como Bax, BclXS y Bak. La activación de proteínas pro-apoptóticas produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal; entre ellas, el citocromo-c^{7,8}.

En caso de concretarse la salida del citocromo-c, éste se asocia con Apaf-1 y después con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 activa que se encarga de desencadenar las últimas fases de la apoptosis^{7,8} (Figura 2).

Asimismo, la vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial pueden converger en la activación de la caspasa-3. El solapamiento y la integración de las dos vías se dan a nivel de Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo-c, la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 3^{4,9}. De esta manera, dependiendo el estímulo y el tipo celular, la activación de la apoptosis se puede dar ya sea por medio de la vía intrínseca, por medio de la vía extrínseca o involucrando a ambos caminos moleculares (Figura 2).

Rol de la apoptosis durante el desarrollo embrionario

La primera evidencia de una base genética de la apoptosis se debió a estudios en el nematodo *Caenor-*

habditis Elegans. Durante la ontogenia de este gusano hermafrodita, 131 de las 1090 células somáticas mueren por apoptosis, dejando un adulto de 959 células. Un estudio genético en mutantes defectivos de muerte celular identificó genes específicos para la regulación, ejecución y resolución de la apoptosis. Esta maquinaria básica de muerte celular está altamente conservada a través de la evolución. Se han hallado proteínas homólogas a las de *C. Elegans* en *Drosophila* y en mamíferos¹⁰.

Si bien, el *C. Elegans* es un excelente modelo y abrió caminos para muchos descubrimientos en el campo de la apoptosis, estudiar la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario en organismos más evolucionados, es experimentalmente complejo. A pesar de que se sabe que la apoptosis es un evento fundamental en las etapas tempranas del desarrollo de diversos organismos multicelulares, la complejidad de su estudio, lleva muchas veces a subestimar sus niveles. Sin embargo, se puede suponer la importancia que posee este fenómeno ya que la inhibición del proceso de apoptosis altera el desarrollo de tal forma, que en muchos casos, el animal no es viable.

La apoptosis está implicada en distintos procesos durante el desarrollo embrionario relacionados con la escultura de las estructuras. El ejemplo más claro es la eliminación de las membranas interdigitales para la formación de los dedos en vertebrados superiores (Figura 3). Otro proceso de formación de estructuras en que esta involucrada la apoptosis es en el vaciado de cuerpos

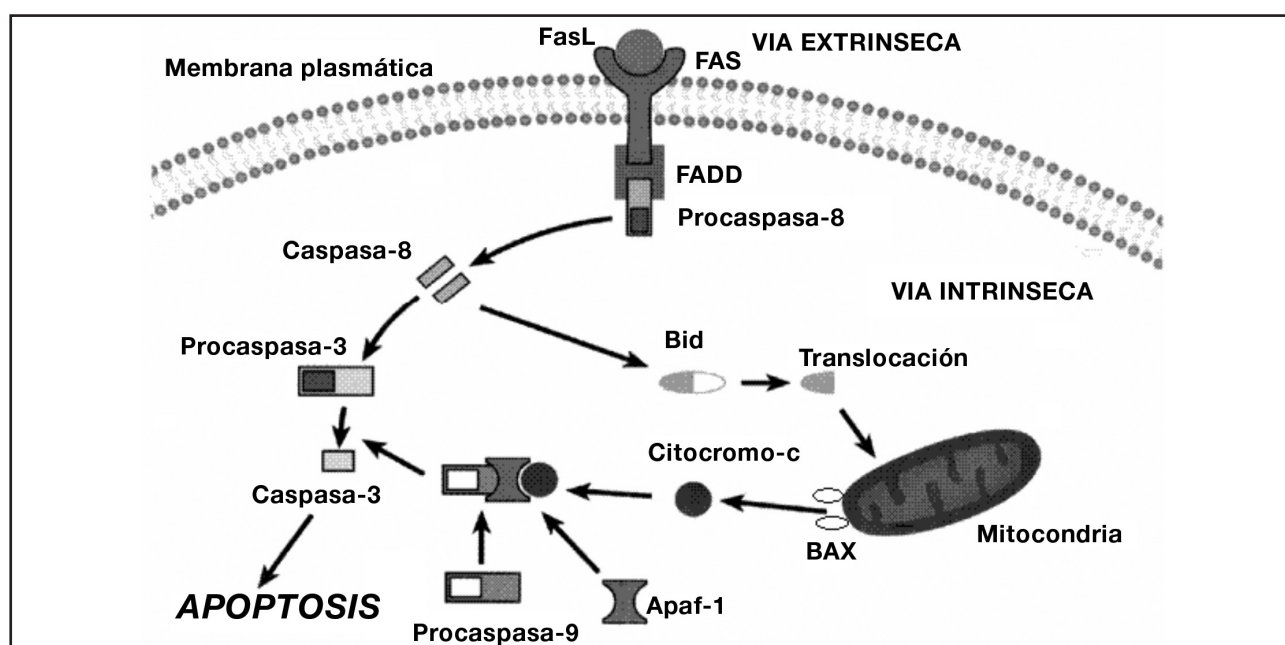
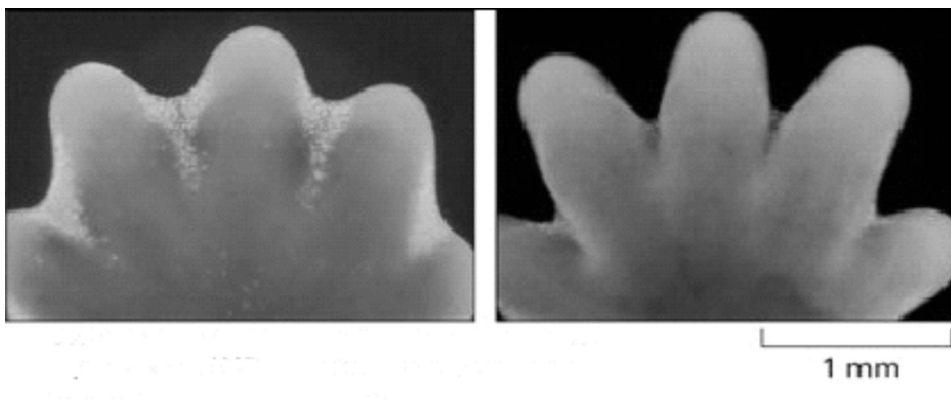


Figura 2: Vías extrínseca e intrínseca de señalización intracelular de apoptosis



Modificada de: B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *The Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition. 2002.

Figura 3: Apoptosis del tejido mesenquimático digital durante la formación de los Dedos

sólidos para crear una luz. Por ejemplo, la formación de la cavidad preamniótica en el embrión de ratón por la muerte de células ectodermas de su interior¹¹.

Asimismo, durante el desarrollo, se relaciona el proceso de apoptosis con la eliminación de estructuras innecesarias en algún estadio de la evolución o para algún sexo en particular. Por ejemplo, en el desarrollo del sistema reproductor, la apoptosis es responsable de la eliminación de los ductos de Müller que forman el útero, y los oviductos en machos de mamíferos y de los ductos de Wolff en hembras¹². Otro ejemplo clásico de inducción de apoptosis durante el desarrollo es la pérdida de la cola durante la metamorfosis de los renacuajos en respuesta al incremento de una hormona tiroidea¹¹.

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

Rol de la apoptosis durante el desarrollo folicular

En los seres humanos, la reserva folicular se establece durante la vida fetal y luego se va eliminando gradualmente. La apoptosis juega un rol fundamental en el desarrollo y en la funcionalidad del ovario. Durante la etapa fetal temprana se forman en el ovario aproximadamente 7×10^6 ovocitos. Este número se reduce drásticamente antes del nacimiento por la muerte por apoptosis, más que nada entre las semanas 14 y 28 de gestación. Por lo menos dos tercios de los ovocitos de la reserva mueren por apoptosis en la etapa prenatal. Al nacer, sólo quedan en el ovario de uno a dos millones de ovocitos, y durante la pubertad sólo se dispone para la ovulación de 300.000 de los siete millones de ovocitos originales y de

éstos, sólo ovularán de 400 a 500. Por lo tanto a lo largo de la vida reproductiva femenina, entre los períodos de pubertad y menopausia, unos 250,000 folículos estarán destinados a morir. Luego de la ovulación, el folículo dominante formará el cuerpo lúteo, siendo la apoptosis también responsable de su regresión o luteólisis^{12,13} (Figura 4).

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

Durante la etapa folicular primordial, poco después del reclutamiento inicial, la FSH adopta el control de la diferenciación y del crecimiento de los folículos. Durante la selección de folículos para su reclutamiento, la FSH permite que algunos folículos antrales escapen a su destino de muerte por apoptosis. Luego, el folículo dominante comienza a segregar elevados niveles de estrógeno e inhibina que reducen la liberación de FSH. Esta acción resulta en una selección negativa de los folículos remanentes en la cohorte que permite que éstos terminen eliminándose por apoptosis (selección negativa). Asimismo, la producción de determinados factores de crecimiento permite la selección positiva del folículo dominante y su ovulación^{14,15}.

Con el fenómeno de luteólisis o regresión del cuerpo lúteo se cierra el ciclo menstrual femenino. La luteólisis es un proceso funcional y morfológico que se inicia cuando decaen los niveles de progesterona. El cuerpo lúteo involuciona en el ovario y en este proceso se han hallado distintas moléculas involucradas en el proceso de apoptosis: TNF, Fas/FasL y caspasa-3. Asimismo se ha asociado a la luteólisis con alteraciones en la expresión de la relación Bcl-2/Bax, confirmando un rol fundamental de la apoptosis en este proceso^{15,16}.

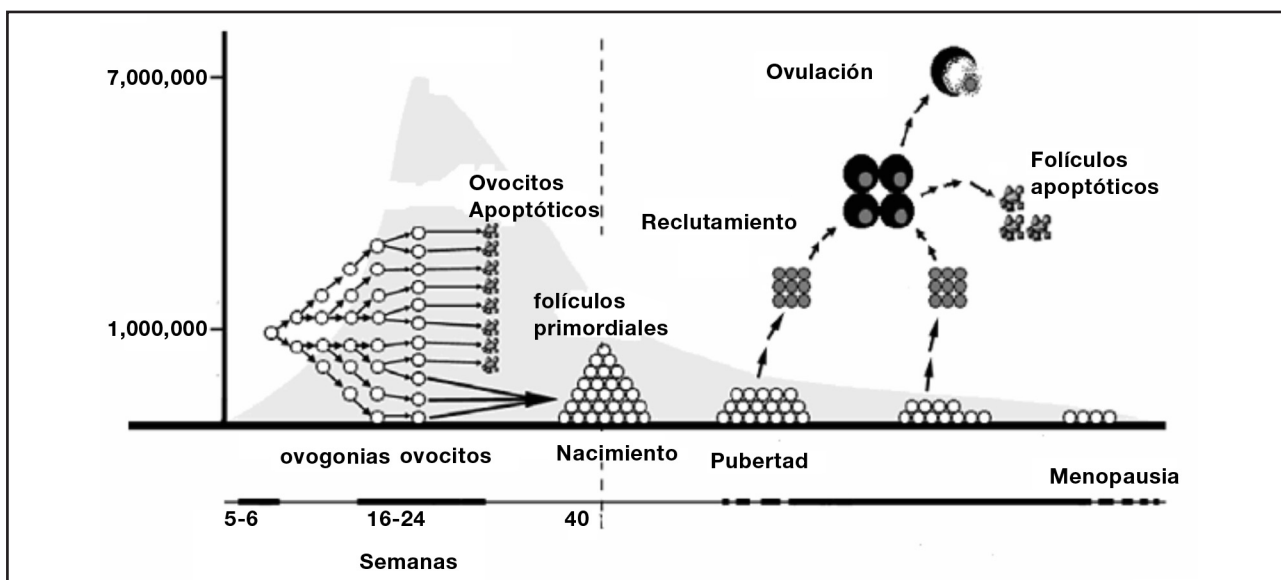


Figura 4: apoptosis durante el desarrollo folicular.

En síntesis, la apoptosis está involucrada tanto en la muerte folicular durante el proceso de reclutamiento del folículo dominante, así como en la luteólisis. La comprensión del rol de la apoptosis en la fisiopatología ovárica podría resultar beneficiosa en el control de ciertas enfermedades. La inducción de apoptosis podría aportar a controlar el proceso de malignidad de los tumores de ovario. Asimismo se están ensayando potenciales estrategias terapéuticas para combatir las fallas ováricas prematuras con el consiguiente beneficio sobre la capacidad reproductiva de la pareja^{13,17}.

Contribución de la apoptosis al desarrollo de la glándula mamaria

La mayor parte del desarrollo de la glándula mamaria ocurre en la etapa post-natal. En condiciones normales la mama no se desarrolla hasta la pubertad, que lo hace bajo el estímulo de las hormonas sexuales femeninas. Durante la pubertad, la apoptosis contribuye a la formación del espacio luminal de los ductos terminales^{18,19} (Figura 5 B).

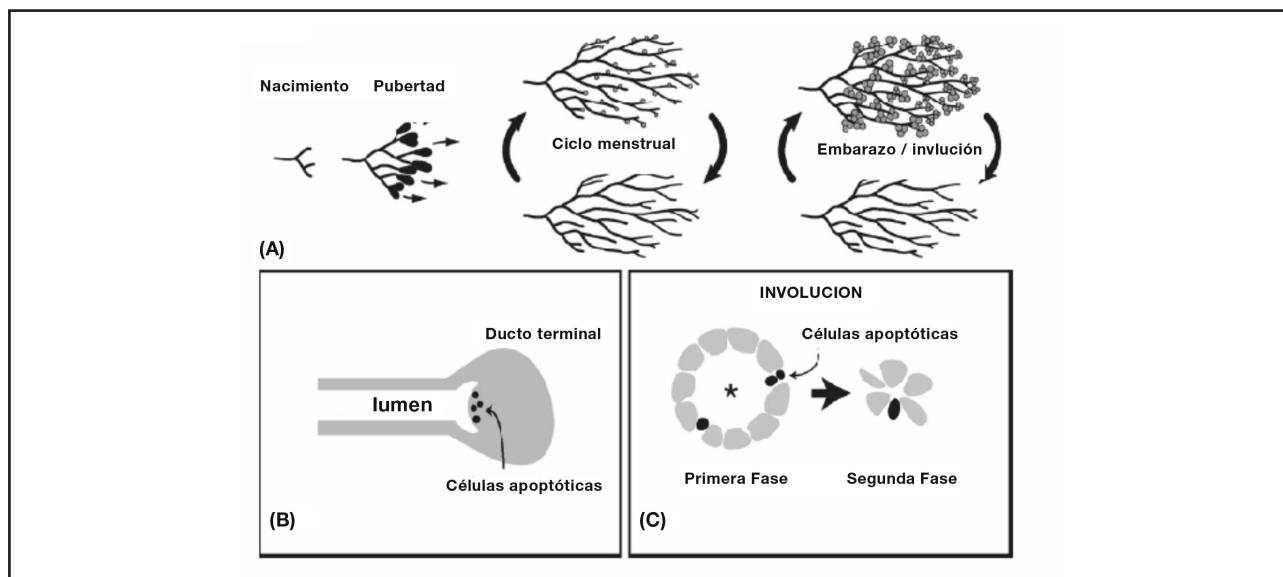


Figura 5: Apoptosis durante el desarrollo e involución de la glándula mamaria. **A**, representación esquemática del desarrollo ductal durante el ciclo menstrual, el embarazo e involución. **B**, esquema de la localización de las células apoptóticas en el ducto terminal. **C**, Esquema de la participación de la apoptosis durante las dos fases de la involución mamaria. Modificada de Jager, 200721.

Asimismo, durante cada ciclo menstrual la glándula mamaria adulta está expuesta a fluctuaciones hormonales periódicas. El epitelio glandular mamario responde a estos cambios atravesando por etapas de proliferación, diferenciación y muerte celular por apoptosis. Durante la fase folicular tardía las células de la glándula mamaria responden a los elevados niveles de estrógeno, proliferando activamente y diferenciándose limitadamente²⁰. En ausencia de embarazo, finalizando el ciclo menstrual, una alta proporción de esas células epiteliales sufren apoptosis, asegurando de esta manera la homeostasis del tejido^{18,21} (Figura 5 A). Se ha identificado expresión máxima de Bcl-2 en la glándula mamaria durante la fase folicular, y de Bax durante la fase lútea, lo que sugiere que la vía intrínseca está implicada en la regulación de este proceso²². Por otro lado, se ha observado que en la formación del lumen de los ductos terminales están implicadas las vías extrínseca e intrínseca de señalización intracelular así como la autofagia²

Durante el embarazo, el aumento en los niveles de estrógeno y progesterona estimula el desarrollo glandular. Las mamas tienden a hacerse esféricas debido al aumento del tejido adiposo. En este período las mamas se vuelven turgentes y aumentan de tamaño. La lactancia tiende a mantener los cambios ocurridos durante el embarazo. Durante estas etapas se produce una proliferación y diferenciación masiva de las células epiteliales de la glándula mamaria. Sin embargo, esa capacidad de crecimiento natural sin una correcta programación del sistema de diferenciación y muerte, podría llevar a la aparición del cáncer. La naturaleza evita esta posibilidad dando lugar, luego del cese de la lactancia, a la regresión del epitelio secretorio en un proceso que se denomina involución. La involución mamaria puede subdividirse en dos etapas: una primera fase caracterizada por apoptosis masiva de las células epiteliales secretorias; y una segunda, caracterizada por una remodelación estructural de la mama^{18,21} (Figura 5 C). A su vez, se ha sugerido que la primera etapa de la involución puede subdividirse en dos estadios, un estadio de iniciación, en el cual la apoptosis se desencadena por los receptores de muerte, y otro estadio tardío, que estaría regulado por la vía intrínseca de apoptosis²¹.

Los receptores de muerte y sus ligandos están involucrados en la involución mamaria. FasL se expresa en la glándula mamaria durante la preñez y la lactancia pero no lo hace en la mama de ratones vírgenes. Por el contrario, su receptor Fas se expresa en la glándula mamaria de ratones vírgenes pero se halla ausente durante la lactancia. Dado que la interacción entre Fas y su ligando es necesaria para la activación de caspasas y el inicio de la apoptosis, la desconexión temporal de la expresión de estas proteínas durante la lactancia, la preñez y en la mama de ratones vírgenes sugiere que el

proceso de apoptosis en esas etapas estaría inactivo. Sin embargo, a partir del primer día de la involución, Fas y FasL coinciden y su expresión aumenta marcadamente, lo que estaría avalando la implicancia de la vía extrínseca en la inducción de apoptosis durante esta etapa. Sin embargo, se sabe que esta no vía no sería la única implicada en la muerte celular durante la involución mamaria, ya que su ausencia sólo retrasa el proceso de involución pero no lo suprime²⁴.

Distintos estudios han demostrado que caspasas iniciadoras y efectoras están involucradas en la involución mamaria post-lactancia²⁵. Se ha observado también que tanto Bax como Bak y Bcl-Xs, todas proteínas pro-apoptóticas, están implicadas en la regulación de la apoptosis de esta etapa²⁶.

De todo lo expuesto podemos deducir que tanto la vía extrínseca como la intrínseca están involucradas en la muerte por apoptosis que ocurre durante la involución mamaria. Se han identificado distintos estímulos que disparan este proceso, sugiriendo que la regulación de la apoptosis durante la involución es multifactorial e implica la yuxtaposición de varias vías de señalización. La inhibición de una de estas vías, no aborta por completo el proceso ya que la importancia del retorno de la mama al estadio pre-preñez es primordial, por lo cual la involución está asegurada por la redundancia de distintos mecanismos de regulación¹⁸.

Apoptosis en el endometrio eutópico y en la endometriosis

El tejido endometrial sufre cambios morfológicos dinámicos a lo largo del ciclo menstrual. Regularmente, durante la fase folicular las células endometriales proliferan en forma activa y, durante la fase secretoria, el crecimiento disminuye²⁷. De este modo, para asegurar el mantenimiento homeostático del tejido, debieran existir mecanismos inhibitorios que contrarresten la proliferación celular endometrial.

Se sabe que la apoptosis juega un rol importante en los cambios cíclicos que ocurren durante el ciclo menstrual. Durante la menstruación, el endometrio uterino se descama y se produce una degeneración del tejido, que involucra tanto procesos de necrosis como de apoptosis²⁸. Sin embargo, a pesar de los avances de los últimos años de la investigación básica, aún no se termina de dilucidar la manera precisa por la cual los mecanismos de apoptosis, arresto del ciclo celular y proliferación celular se combinan e interaccionan en el endometrio humano.

Las células endometriales bajo condiciones apropiadas, sufren apoptosis. En 1976, Hopwood y col. realizaron el primer estudio de apoptosis en el endome-

trio humano e identificaron cambios en la apoptosis de las células glandulares epiteliales a lo largo del ciclo menstrual²⁹. Más tarde, distintos autores describieron que la apoptosis del epitelio glandular endometrial varía a lo largo del ciclo reproductivo: aumenta durante la fase secretoria y alcanza un pico en la menstruación^{28,30,31}.

Se han estudiado también los cambios cíclicos de la expresión de la proteína reguladora de apoptosis Bcl-2. Se ha sugerido que la expresión de Bcl-2 en el endometrio humano estaría regulada *in-vivo* por la circulación de las hormonas esteroideas ováricas^{31,32}. Se determinó que la inmunoreactividad de las proteínas Bcl-2 y Bax es predominante en las células del epitelio glandular del endometrio, y se confirmó que durante la fase proliferativa prevalece la proteína Bcl-2, mientras que la expresión de la proteína Bax incrementa significativamente en la fase secretoria cuando prevalece la apoptosis³¹. De estos hallazgos se deduce la importancia de los oncogenes Bcl-2 y Bax en la regulación del crecimiento endometrial, aunque también se ha hallado involucrada la vía extrínseca en la regulación de la apoptosis que ocurre durante el ciclo menstrual^{33,34}. En particular se ha hallado expresión aumentada de FasL y aumento de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 durante la fase secretoria y menstrual^{35,36}.

Así como la apoptosis está involucrada en los cambios en el tejido endometrial que ocurren a nivel fisiológico, se ha asociado a la muerte celular programada con procesos patológicos, más que nada en aquellos caracterizados por el incremento en el crecimiento celular como es el caso de la endometriosis.

La endometriosis se define como la presencia de focos de tejido endometrial funcionante fuera de la cavidad uterina. Es la enfermedad ginecológica más frecuente, afectando aproximadamente a un 10% de las mujeres en edad reproductiva. Por otro lado, un 20-50% de las pacientes que se someten a laparoscopias por dolor pélvico, presentan esta patología³⁷. Su origen es aún hoy discutido, sin embargo, la teoría más aceptada postula que se origina por migración de células del endometrio eutópico a la cavidad peritoneal³⁸. Actualmente se conoce que el tejido endometrial eutópico de las pacientes con endometriosis posee diferencias significativas con respecto al tejido uterino de las mujeres sin la enfermedad. Estas desigualdades observadas por diversos investigadores, otorgan sustento al concepto de que el endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis es inherentemente anómalo, y juega un rol importante en la etiopatogenia de la enfermedad³⁹. La proliferación celular y la muerte por apoptosis, son dos de las vías biológicas más importantes que normalmente regulan el crecimiento y la homeostasis tisular. En trabajos previos hemos observado una inhibición significativa de la apoptosis y

un incremento de la proliferación celular del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis⁴⁰. Los bajos niveles de apoptosis observados por nuestro grupo, tanto en células epiteliales como en estromales, han sido reportados también por Dmowski y colaboradores en el tejido endometrial completo, quienes propusieron que la supervivencia de las células endometriales en un sitio ectópico dependería, en parte, de la capacidad inherente de las células para morir o no por apoptosis⁴¹.

Como ya se dijo, la muerte celular programada es controlada por la expresión de un número de genes regulatorios que incluyen, entre otros, al Bcl-2, que promueve la supervivencia celular bloqueando la apoptosis, y al Bax que antagoniza la actividad de supervivencia promovida por el Bcl-2. En estudios previos hemos observado que la capacidad de supervivencia aumentada que poseen las células endometriales de las pacientes con endometriosis, estaría regulada por el aumento de la proteína Bcl-2 y la disminución de Fas y FasL, lo que estaría sugiriendo un rol protagónico de estas moléculas en la regulación de la apoptosis endometrial^{41,42}.

Asimismo, en endometriosis el fluido peritoneal posee una proporción significativamente mayor de macrófagos peritoneales que expresan Bcl-2 que el grupo control; mientras que en el líquido de mujeres sin endometriosis, la proporción de macrófagos peritoneales que expresan Bax está significativamente aumentada⁴³. Todas estas evidencias sugieren una predisposición de las células endometriales a ser resistentes a la apoptosis y a continuar sobreviviendo, lo que tendría importantes consecuencias en la proliferación del tejido endometrial ectópico.

La medicación utilizada para tratar la endometriosis incluye, entre otros protocolos, el uso de agonistas de GnRH o anticonceptivos orales, basándose en la sensibilidad del tejido endometriótico a responder a hormonas ováricas. En estudios previos, hemos observado que los anticonceptivos orales estarían modulando el crecimiento endometrial en las pacientes con endometriosis, a través de la inducción de la muerte celular programada y de la inhibición de la proliferación celular, dos de los factores que tendrían implicancias en el crecimiento y en la recurrencia de la enfermedad⁴². El rol de los estrógenos en la estimulación de la proliferación celular endometrial, tanto *in-vivo*⁴⁴ como *in-vitro*⁴⁵, ha sido muy estudiado. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual los esteroides sexuales regulan el crecimiento endometrial, aún no está definido. Un trabajo realizado por Rider y col.⁴⁶, ha propuesto que los estrógenos serían esenciales para la síntesis del receptor de progesterona y de factores de crecimiento necesarios para el progreso de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular. Asimismo, la administración de progestágenos ha demostrado estar involucrada en la inhibición de la proliferación endometrial⁴⁷, y se ha sugerido también una

posible implicancia de estos compuestos sobre la inducción de la apoptosis⁴⁸.

Los agonistas y, más recientemente, los antagonistas de GnRH se emplean en el tratamiento de la endometriosis, sobre la base de una dependencia hormonal de los implantes ectópicos. El endometrio humano posee receptores de GnRH, tanto en la fracción estromal como en la epitelial, que se expresan durante todo el ciclo menstrual⁴⁹. Los agonistas de GnRH, por un mecanismo de desensibilización hipofisaria, reducen en forma reversible la producción de gonadotrofinas y, como consecuencia, se suprimen los esteroides ováricos circulantes. Los estudios del impacto del tratamiento con agonistas de GnRH sobre las lesiones endometriósicas, demuestran que los tamaños de las lesiones se reducen de forma significativa, independientemente de la gravedad de las mismas, y en una proporción muy semejante sobre cada una de ellas^{50,51}. Adicionalmente, se sabe que los agonistas de GnRH inducen la muerte celular por apoptosis en otros sistemas como en folículo ovárico, cuerpo lúteo, células de granulosa en cultivo⁵² y en células provenientes de miomas uterinos⁵³. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en un modelo experimental de endometriosis *in-vitro*, han demostrado que tanto los agonistas como los antagonistas de GnRH estarían modulando el crecimiento endometrial en las pacientes con endometriosis a través de la inducción de la muerte celular programada mediada por las vías extrínseca e intrínseca, y a través de la inhibición de la proliferación celular, dos de los factores que tendrían implicancias en el desarrollo y en la recurrencia de la enfermedad⁵⁴.

Por otro lado, es sabido que la terapéutica que se les propone actualmente a las pacientes con endometriosis no es del todo efectiva, ya que la infertilidad asociada a la patología no siempre es revertida y, además, son habituales los casos de recidivas luego de la medicación supresora o de la terapia quirúrgica⁵⁵. Dada esta situación, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes, y que acarreen menos efectos colaterales, es constante. Entre las nuevas opciones para tratar la endometriosis, últimamente se ha propuesto a los inhibidores de aromatasa y a los inhibidores de la enzima ciclo-oxigenasa-2 (COX-2).

Los inhibidores de aromatasa anastrozole y letrozole son utilizados con éxito en la terapéutica del cáncer de mama⁵⁶. Además del efecto supresor de la síntesis de estrógenos, se conocen efectos inductores de la apoptosis y anti-proliferativos directos de estos compuestos sobre algunos tipos celulares⁵⁷. En un estudio reciente hemos observado que, tanto anastrozole como letrozole, disminuyen la proliferación celular e incrementan la apoptosis en las células epiteliales endometriales de pacientes con endometriosis⁵⁸.

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) como la Aspirina o el Ibuprofeno inhiben la actividad de COX. Celecoxib pertenece a una nueva generación de AINEs que inhiben selectivamente COX-2 sin inhibir COX-1. Asimismo, este compuesto está siendo últimamente evaluado por sus efectos inhibitorios de la progresión tumoral. Específicamente, han sido descritos efectos anti-angiogénicos, anti-proliferativos y pro-apoptóticos tanto *in-vitro*, *in-vivo*, como en ensayos clínicos actualmente en curso⁵⁹⁻⁶¹. Más aún, en estudios recientes se ha demostrado que celecoxib inhibe el crecimiento tumoral, induciendo la apoptosis de manera independiente de su capacidad para bloquear la COX-2^{60,62}. Se ha propuesto además que celecoxib actuaría en forma sinérgica con inhibidores de aromatasa en el tratamiento del cáncer de mama, efecto que también se está evaluando a través de un estudio clínico actualmente en curso⁵⁶. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio sugieren que celecoxib favorecería la regresión de la lesión endometriósica, inhibiendo la proliferación celular, induciendo la apoptosis y disminuyendo la angiogénesis, y avalan a esta droga para continuar siendo evaluada como alternativa terapéutica para la endometriosis⁶³.

En síntesis, la muerte celular programada es un evento sumamente complejo y finamente regulado, que está involucrado tanto en la fisiología como en la patología del sistema reproductor femenino. El delicado balance entre la apoptosis y la proliferación celular es fundamental, ya que permite que los tejidos puedan responder en forma cíclica a los cambios hormonales que acontecen en la vida reproductiva de las mujeres. Por otro lado, se han detectado defectos en los niveles de apoptosis en ciertas patologías de tejidos reproductivos como en la endometriosis, donde la investigación básica está aportando nuevos fundamentos para utilizarlos en la búsqueda de alternativas terapéuticas más eficientes.

Bibliografía

1. Van Cruchten S, Van Den BW. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002;31:214-23
2. Assuncao GC, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004;271:1638-50
3. Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997;37:215-28
4. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 2003;15:185-93
5. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):1-16

6. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003;10:26-35
7. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:47-59
8. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003;7:249-57
9. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-911
10. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-9
11. Abud HE. Shaping developing tissues by apoptosis. *Cell Death Differ* 2004;11:797-9
12. Capel B. The battle of the sexes. *Mech Dev* 2000;92:89-103
13. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005;11:162-77
14. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000;21:200-14
15. Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002;123:23-30
16. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4379-86
17. Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenabeele P, D'Herde K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 2008;13:1065-87
18. Green KA, Streuli CH. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1867-83
19. Humphreys RC, Krajewska M, Krnacik S, Jaeger R, Weiher H, Krajewski S, Reed JC, Rosen JM. Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development* 1996;122:4013-22
20. Andres AC, Strange R. Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999;4:221-8
21. Jager R. Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue culture experiments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;63:231-40
22. Feuerhake F, Sigg W, Hoftner EA, Unterberger P, Welsh U. Cell proliferation, apoptosis, and expression of Bcl-2 and Bax in non-lactating human breast epithelium in relation to the menstrual cycle and reproductive history. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77:37-48
23. Mills KR, Reginato M, Debnath J, Queenan B, Brugge JS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3438-43
24. Mor G, Straszewski S, Kamsteeg M. Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1305-15
25. Marti A, Graber H, Lazar H, Ritter PM, Baltzer A, Srinivasan A, Jaggi R. Caspases: decoders of apoptotic signals during mammary involution. Caspase activation during involution. *Adv Exp Med Biol* 2000;480:195-201
26. Metcalfe AD, Gilmore A, Klinowska T, Oliver J, Valentijn AJ, Brown R, Ross A, MacGregor G, Hickman JA, Streuli CH. Developmental regulation of Bcl-2 family protein expression in the involuting mammary gland. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 11):1771-83
27. Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A. Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:50-63
28. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004;10:29-38
29. Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 1976;119:159-66
30. Harada T, Taniguchi F, Izawa M, Ohama Y, Takenaka Y, Tagashira Y, Ikeda A, Watanabe A, Iwabe T, Terakawa N. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci* 2007;12:3140-51
31. Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL, Isaacson KB. Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2738-46
32. Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998;13:3496-502
33. Wei P, Jin X, Tao SX, Han CS, Liu YX. Fas, FasL, Bcl-2, and Bax in the endometrium of rhesus monkey during the menstrual cycle. *Mol Reprod Dev* 2005;70:478-84
34. Yamashita H, Otsuki Y, Matsumoto K, Ueki K, Ueki M. Fas ligand, Fas antigen and Bcl-2 expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999;5:358-64
35. Otsuki Y. Apoptosis in human endometrium: apoptosis

totic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 2001;34:166-73

36. Selam B, Kayisli UA, Mulayim N, Arici A. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod* 2001;65:979-85

37. Wu MH, Shoji Y, Chuang PC, Tsai SJ. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Rev Mol Med* 2007;9:1-20

38. Child TJ, Tan SL. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs* 2001;61:1735-50

39. Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:467-76

40. 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

41. Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4:696-701

42. Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:1141-7

43. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK. Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 1997;12:146-52

44. Deligdisch L. Hormonal pathology of the endometrium. *Mod Pathol* 2000;13:285-94

45. Pierro E, Minici F, Alesiani O, Miceli F, Proto C, Screpanti I, Mancuso S, Lanzone A. Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium. *Biol Reprod* 2001;64:831-8

46. Rider V, Kimler BF, Justice WM. Progesterone-growth factor interactions in uterine stromal cells. *Biol Reprod* 1998;59:464-9

47. Moyer DL, Felix JC. The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. *Contraception* 1998;57:399-403

48. Critchley HO, Tong S, Cameron ST, Drudy TA, Kelly RW, Baird DT. Regulation of bcl-2 gene family members in human endometrium by antiprogestin administration in vivo. *J Reprod Fertil* 1999;115:389-95

49. Grundker C, Schlotawa L, Viereck V, Eicke N, Horst A, Kairies B, Emons G. Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated

through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol* 2004;151:141-9

50. Borroni R, Di Blasio AM, Gaffuri B, Santorsola R, Busacca M, Viganò P, Vignali M. Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:37-43

51. Vignali M. Molecular action of GnRH analogues on ectopic endometrial cells. *Gynecol Obstet Invest* 1998;45 Suppl 1:2-5

52. Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H, Tesone M. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol Reprod Dev* 1998;51:287-94

53. Wang Y, Matsuo H, Kurachi O, Maruo T. Down-regulation of proliferation and up-regulation of apoptosis by gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured uterine leiomyoma cells. *Eur J Endocrinol* 2002;146:447-56

54. Bilotas M, Baranao RI, Buquet R, Sueldo C, Tesone M, Meresman G. Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod* 2007;22:644-53

55. Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, Ragni N. Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Surv* 2005;60:817-26

56. Goss PE. Breast cancer prevention--clinical trials strategies involving aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86:487-93

57. Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003;63:8037-50

58. 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

59. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R422-R435

60. Jendrosseck V, Handrick R, Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 2003;17:1547-9

61. Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Dallel R, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004;82:1609-15

62. Lai GH, Zhang Z, Sirica AE. Celecoxib acts in a cyclooxygenase-2-independent manner and in synergy with emodin to suppress rat cholangiocarcinoma growth in vitro through a mechanism involving enhanced Akt inactivation and increased activation of caspases-9 and -3. *Mol Cancer Ther* 2003;2:265-71

63. Olivares C, Bilotas M, Buquet Borghi M, Sueldo C, Tesone M, Meresman G. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008;23(12):2701-8