

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



Facultad de Farmacia y Bioquímica

Laboratorio de Fisiopatología Endometrial

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

***“Evaluación de nuevas alternativas terapéuticas
naturales para el tratamiento de la endometriosis”***

Lic. Luciana Ferella

Directora: Dra. Gabriela Meresman

Directora Adjunta: Dra. Carla Olivares

Consejera de estudios: Dra. Leonor Roguin

Abril 2018

Tesis presentada por la Lic. Luciana Ferella para optar al título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires.

Lic. Luciana Ferella

Dra. Gabriela Meresman

Dra. Carla Olivares

Dra. Leonor Roguin

Agradecimientos

Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda y participación de muchas personas a quienes les debo mínimamente estas palabras de agradecimiento.

A Gaby por haber confiado en mí, por haberme guiado y acompañado en todo momento. Agradezco haber tenido una directora como ella, no solo por la indiscutible predisposición que me demostró siempre sino por su calidad humana, sus valores y el ejemplo que me inculcó.

A Carli y Juani, por su paciencia y por el tiempo que le dedicaron a esta tesis. Gracias por haberme hecho sentir siempre cómoda, por los consejos y la ayuda incondicional, siempre con buen humor demostrándome que nada era tan difícil como parecía. Excelentes compañeros y personas desde donde se los mire, gracias!

Al Laboratorio 202, en el cual pasé innumerables horas usurpando mesada, robando mates, compartiendo festejos y almuerzos. Gracias Ine por tu colaboración y compañía. Ani y Mariel, millones de gracias por la buena onda de siempre, por sus consejos y por tanta ayuda. Y a las más jóvenes del equipo, que se fueron sumando de a poco y terminaron siendo grandes amigas, gracias Barby, Dani y Tati por todo lo compartido y por haber estado a disposición para lo que sea!

Gracias a ambos laboratorios, 202 y 204, trabajar en un ambiente así es invaluable!

A Kari, Ale y Anita, con los que compartimos cada día siempre con la mejor energía y buena onda.

Al IBYME y a todas las personas con las que compartí momentos, charlas, congresos y salidas.

A la combi del oeste que hizo más fácil mi vida! Por las eternas horas en el auto, los infaltables mates y por las charlas mas ocurrentes y locas que hicieron más ameno cada viaje. Gracias Marin, Ani y Maite por todas esas risas!

A mi familia y amigos, que incluso entendiendo poco de que se trata todo esto, siempre estuvieron pendientes demostrándome su apoyo e interés.

A esas amigas que me acompañaron de cerca, que se alegraron con mis logros y que también supieron cómo hacerme olvidar de los problemas: Carozo, Lari, Maru, Noe, Flor y Aldi. Y a las que conocí gracias a la genética con quienes seguimos compartiendo la misma locura: Lu y Sol. Gracias a todas por estar presentes en esta etapa más de mi vida.

A la Nona que me ilumina y acompaña desde donde esté.

A mi hermana y mejor amiga por ser mi confidente. Por su ayuda y apoyo incondicional. Gracias infinitas!

Y a mis viejos, que son incondicionales, que me apoyan en todo lo que hago y que estuvieron siempre pendientes, ayudándome desde donde podían, aconsejándome y alentándome. Gracias por su amor y gracias porque son el mejor ejemplo que podría tener!

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en:

Congresos nacionales

- “Inhibición del crecimiento endometrial in-vitro por parte de compuestos de origen natural evaluados como nuevas alternativas terapéuticas para la endometriosis” Ferella L, Bastón JI, Olivares CN, Vojnov A, Meresman GF. Congreso SAIC-SAFIS-SAFE LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS), XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). 20 al 23 de Noviembre, 2013. Mar del Plata, Argentina. *MEDICINA* - Volumen 73 - (Supl. III): 245, 2013.

- “Natural compounds evaluated as new therapeutic agents for the treatment of endometriosis” Ferella L, Bastón JI, Bilotas M, Singla JJ, González AM, Olivares C, Meresman GF. XVI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. 1 al 3 de Diciembre, 2014. Chascomús, Buenos Aires, Argentina. *BIOCELL* - Volumen 39 (Supl. 3): 11, 2015.

- “Compuestos activos provenientes del romero y de la medicina herbal china evaluados como nuevas terapias naturales para el tratamiento de la endometriosis” Ferella L, Bastón JI, Bilotas M, Singla JJ, González AM, Olivares CN, Meresman GF. LX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de investigación Clínica (SAIC), Reunión anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). 18 al 21 de Noviembre, 2015. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. *MEDICINA* - Volumen 75 - (Supl. II): 58, 2015.

- “Natural compounds present in *Scutellaria baicalensis* and *Rosmarinus officinalis* induce cell cycle arrest in human endometrial stromal and mast cell lines” Ferella L, Bastón JI, Olivares CN, McCormack B, Simitsidellis I, Collins F, Saunders PTK, Meresman GF. Reunión conjunta de Sociedades de Biociencias. 13 al 17 de Noviembre, 2017. Buenos Aires, Argentina. *MEDICINA* - Volumen 77 - (Supl. I): 494-495, 2017.

Congresos internacionales

- “*In vitro* and *in vivo* endometrial growth inhibition by natural compounds evaluated as new therapeutic agents for endometriosis” Ferella L, Bastón JI, Olivares CN, Meresman GF. 12th World Congress on Endometriosis. 30 de Abril al 3 de Mayo, 2014. San Pablo, Brasil.

- “Endometrial growth inhibition by natural compounds evaluated as new therapeutic agents for Endometriosis” Ferella L, Bastón JI, Bilotas M, Singla JJ, Gonzalez AM, Olivares CN, Meresman GF. 31st Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology. 14 al 17 de Junio, 2015. Lisboa, Portugal. Human Reproduction, volumen 30, (Suppl 1):254, 2015.

- “Active biomolecules present in *Scutellaria baicalensis* and *Rosmarinus officinalis* induce cell cycle arrest in *in-vitro* model of endometriosis” Ferella L, Bastón JI, Bilotas M, McCormack B, Singla JJ, Gonzalez AM, Olivares CN, Meresman GF. 33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology. 2 al 5 de Julio, 2017. Génova, Suiza. Human Reproduction, volumen 32, (Suppl 1):266, 2017

- “Estudio del efecto oxidativo e inhibitorio del crecimiento celular endometrial de tres compuestos de origen natural considerados como nuevas alternativas terapéuticas para la endometriosis” Ferella L, Bastón JI, McCormack BA, Madanes D, Olivares CN, Meresman GF. XXV Reunión bienal de la asociación latinoamericana de investigadores en reproducción humana. 20 al 24 de Noviembre, 2017. Barranquilla, Colombia.

Revistas internacionales con referato

- “Active compounds present in *Rosmarinus officinalis* leaves and *Scutellaria baicalensis* root evaluated as new therapeutic agents for endometriosis” Ferella L, Bastón JI, Bilotas MA, Singla JJ, González AM, Olivares CN, Meresman GF. Reproductive Biomedicine Online. Trabajo enviado el 16 de Marzo, 2018.

Índice

Resumen.....	1
Summary.....	4
Abreviaturas.....	5
1. Introducción	8
Definición y localización de la endometriosis.....	8
Prevalencia de la endometriosis.....	9
Etiología de la endometriosis.....	10
Metaplasia celómica	10
Propagación vascular.....	10
Células madres progenitoras	11
Teoría de la implantación de tejido endometrial por menstruación retrógrada....	11
Sintomatología de la endometriosis.....	13
Diagnóstico de la endometriosis.....	14
Clasificación de la endometriosis.....	15
Mecanismos fisiopatológicos de la endometriosis	16
Características del endometrio eutópico de mujeres con endometriosis.....	17
El rol del sistema inmunológico.....	17
Mecanismos involucrados en la supervivencia de las células endometriósicas en un sitio ectópico	19
El estrés oxidativo en la endometriosis.....	20
Dolor asociado a la endometriosis.....	23
Terapéutica de la endometriosis.....	24
Tratamiento quirúrgico	25
Tratamiento farmacológico	25
Terapias alternativas: Las ventajas de los compuestos naturales	27
Romero	28
Medicina herbaria china y Wogonina	30
2. Hipótesis y Objetivos	33
Hipótesis	33
Objetivos.....	33

3. Materiales y métodos	36
Modelos experimentales	36
Experimentos <i>in vitro</i>	37
Biopsias de endometrio de pacientes con endometriosis y mujeres control	37
Aislamiento y cultivo primario de células estromales de endometrio humano	37
Evaluación de la proliferación celular de cultivos primarios	38
Cultivo de la línea celular estromal endometrial humana T-HESC	39
Evaluación de la proliferación de células T-HESC.....	39
Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo en células T-HESC.....	40
Evaluación de la apoptosis en células T-HESC	40
Evaluación de la expresión proteica por Western blot en células T-HESC.....	41
Determinación de especies reactivas del oxígeno en células T-HESC.....	43
Evaluación de los niveles de estradiol en medios condicionados de células T-HESC	44
Cultivo de la línea celular de mastocitos humanos HMC1.1	44
Evaluación del ciclo celular por qRT-PCR en células HMC1.1	45
Extracción de ARN y síntesis de ADNc de células HMC1.1	45
PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	45
Experimentos <i>in vivo</i>	46
Cirugía para la inducción de la endometriosis.....	46
Diseño Experimental.....	47
Evaluación de las lesiones endometriósicas.....	49
Evaluación de la proliferación celular en las lesiones endometriósicas	49
Evaluación de la apoptosis en las lesiones endometriósicas.....	50
Análisis estadístico	50
4. Resultados	52
Efectos del ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre la regulación del crecimiento de células estromales endometriales humanas utilizadas como modelo experimental de endometriosis.....	52
Evaluación de la proliferación de células estromales endometriales	52
Evaluación del ciclo celular en células T-HESC	55
Evaluación de la apoptosis en células T-HESC	59

Evaluación de la generación de especies reactivas del oxígeno en T-HESC	62
Evaluación de la expresión de receptores de estrógenos y secreción de estradiol en T-HESC	64
Efecto del ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre la regulación del ciclo celular de mastocitos humanos	66
Evaluación del ciclo celular en HMC1.1	66
Efectos del tratamiento con ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre el desarrollo de lesiones endometriósicas inducidas en ratón	68
Efecto del AC, AR y WG sobre el volumen y el número de las lesiones endometriósicas	68
Evaluación de proliferación celular en las lesiones endometriósicas	70
Evaluación de la apoptosis en las lesiones endometriósicas	72
5. Discusión	74
6. Conclusiones	89
7. Referencias bibliográficas	91

Resumen

Evaluación de nuevas alternativas terapéuticas naturales para el tratamiento de la endometriosis

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna caracterizada por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Afecta al 10% de las mujeres en edad reproductiva siendo los síntomas más importantes el dolor pelviano crónico y la infertilidad. El tratamiento actual consiste en una intervención quirúrgica mediante la cual las lesiones endometriósicas son extirpadas, seguido de un tratamiento farmacológico que disminuye los niveles de estrógenos en sangre. Si bien inicialmente resulta efectivo, se sabe que la administración de estas drogas conlleva efectos adversos indeseados, retraso de la posibilidad de gestar un embarazo y aumento de la reincidencia de la enfermedad al interrumpir el tratamiento. Siendo así, resulta indispensable la búsqueda de alternativas terapéuticas que resulten inocuas, con compuestos que inhiban los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad y que potencialmente puedan ser administrados por periodos prolongados sin interferir sobre la posibilidad de lograr un embarazo.

Dado que los productos de origen natural cumplen con estas condiciones, hace algunos años nuestro grupo ha iniciado la búsqueda de posibles fitoterapéuticos para el control de la endometriosis. En esos trabajos, polifenoles derivados del té verde y de los frutos rojos demostraron poseer claros efectos inhibitorios sobre el desarrollo de la endometriosis experimental. La continuación de esta búsqueda, nos ha conducido a proponer como objetivo de este trabajo la evaluación de compuestos bioactivos de dos especies vegetales con probados efectos terapéuticos beneficiosos: *Rosmarinus officinalis* y *Scutellaria baicalensis*, sobre distintos modelos de endometriosis experimental.

El ácido carnósico es un diterpeno fenólico y el ácido rosmarínico un polifenol. Ambos constituyen dos de las moléculas bioactivas más abundantes de las hojas del romero (*Rosmarinus officinalis*) y son responsables de la actividad antioxidante del arbusto. Se les han atribuido funciones antitumorales, antiinflamatorias y antinociceptivas. Estudios realizados en diversas líneas celulares tumorales han demostrado que son capaces de inhibir la proliferación, inducir apoptosis y así controlar su crecimiento. Los efectos antitumorales observados en modelos *in vivo* incluyen mecanismos antimetastásicos, antiinvasivos y antiangiogénicos. Si bien se

conoce su acción inhibitoria tumoral, sus efectos en endometriosis no habían sido estudiados hasta el momento.

Por otra parte, la medicina china a base de hierbas está siendo utilizada por millones de pacientes con endometriosis con excelentes resultados. La ventaja de esta medicina oriental es que no provoca efectos adversos y aún más, disminuye el dolor premenstrual y mejora los parámetros de fertilidad comparada a la medicina tradicional occidental. A pesar de estos claros beneficios, no se conoce el modo de acción específico de esta combinación de hierbas. *Scutellaria baicalensis*, conocida en China por su nombre Huang Qin, es una planta originaria del continente asiático cuya raíz contiene wogonina, un flavonoide que constituye una de las principales moléculas bioactivas de la medicina herbaria china. La acción de wogonina ha sido asociada con procesos antitumorales, antiinflamatorios y antiproliferativos. Se ha reportado que este compuesto es capaz de controlar el crecimiento celular, inducir apoptosis e inhibir la proliferación de células tumorales. A pesar de que conocemos los efectos favorables de la medicina china a base de hierbas, los mecanismos directos de sus moléculas activas sobre la inhibición del crecimiento de las lesiones endometriósicas no habían sido investigados hasta el momento.

La importancia de este trabajo radica en que por primera vez se evaluó el efecto de tres compuestos naturales: ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina, sobre modelos experimentales de endometriosis. Hemos evidenciado un potente efecto antiproliferativo sobre cultivos primarios de células endometriales estromales humanas provenientes de biopsias de mujeres controles y mujeres con endometriosis, así como también sobre la línea celular endometrial estromal humana T-HESC. El ácido carnósico y la wogonina además indujeron arresto del ciclo celular en el estadio G2/M en la línea celular T-HESC.

Comprobamos además la actividad antioxidante del ácido rosmarínico sobre células T-HESC, y descubrimos la capacidad prooxidante de wogonina sobre estas células.

Conociendo el papel clave de los estrógenos en la endometriosis, resulta novedoso que wogonina haya sido capaz de disminuir la expresión del receptor de estrógenos alfa en la línea celular T-HESC. Sin embargo no se detectaron diferencias en la secreción de estradiol, indicando que los efectos obtenidos sobre el crecimiento endometrial no estarían mediados por esta vía.

Asimismo, dada la importancia que cumplen los mastocitos en los procesos de inflamación y dolor, y basándonos en los antecedentes observados en las células estromales sobre la inducción del arresto del ciclo, evaluamos la expresión de 5 genes que participan activamente en la progresión de G2 a mitosis en la línea celular de

mastocitos humanos HMC1.1. Observamos un efecto similar al que habíamos visto sobre las células T-HESC. El ácido carnósico y la wogonina regularon la expresión de dichos genes, mientras que el ácido rosmarínico no provocó alteraciones.

Complementariamente, en el modelo *in vivo* de endometriosis experimental pudimos demostrar que los tres compuestos inhibieron el crecimiento de las lesiones endometriósicas inducidas quirúrgicamente en los ratones. Luego de cada tratamiento observamos una disminución significativa de la proliferación de las células estromales y epiteliales de las lesiones y en el caso de los tratamientos con ácido rosmarínico y wogonina además se evidenció un efecto proapoptótico.

Sin perder de vista que queda mucho camino por recorrer, consideramos a estos resultados como promisorios ya que aportan contundentes evidencias para continuar en la búsqueda de potenciales estrategias terapéuticas para el tratamiento para la endometriosis.

Palabras clave: endometriosis, ácido carnósico, ácido rosmarínico, wogonina.

Summary

Natural therapeutic alternatives evaluated for endometriosis treatment

Endometriosis is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Current therapies are inefficient and carry several adverse effects. Our objective was to evaluate the effect of carnosic acid (CA) and rosmarinic acid (RA), compounds found in *Rosmarinus officinalis* and of wogonin (WG), an active constituent of Chinese herbal medicine, on experimental endometriosis models. CA 10µg/ml; RA 100µg/ml and WG 80µM inhibited endometrial stromal cells proliferation in primary cultures and in the endometrial T-HESC cell line ($p < 0.05$). Moreover, CA and WG induced cell cycle arrest at the G2/M phase ($p < 0.01$) but apoptosis was not augmented. WG reduced ER α expression in T-HESC ($p < 0.01$), however estradiol secretion was not altered. Furthermore, RA reduced intracellular ROS accumulation ($p < 0.001$) while WG increased them, suggesting a pro-oxidant effect ($p < 0.05$). On a mast cell line, CA and WG regulated the expression of genes involved in G2/M cell cycle progression. *In-vivo*, CA 20mg/kg/day, RA 3mg/kg/day and WG 20mg/kg/day reduced endometriotic-like lesions size ($p < 0.05$). All compounds decreased the percentage of cells in proliferation ($p < 0.05$), while AR and WG increased the percentage of apoptotic cells in murine endometriotic-like lesions ($p < 0.05$). These findings are promising and support further investigation of these compounds as new therapeutics for endometriosis.

Key words: endometriosis, carnosic acid, rosmarinic acid, wogonin.

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
17β-HSD	17-beta hidroxiesteroide deshidrogenasa
AA	Antibiótico-antimicótico
AC	Ácido carnósico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINEs	Drogas anti-inflamatorias no esteroideas
AR	Ácido rosmarínico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASRM	Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
Bax	Ligando pro-apoptótico denominado Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Ligando anti-apoptótico derivado de linfoma de células B
BSA	Albúmina sérica bovina
CDK1	Quinasa dependiente de ciclina 1
CHM	Medicina china a base de hierbas
COX-2	Ciclo-oxigenasa 2
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DMEM/F12	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco/F-12 de Ham
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGCG	Galato de epigallocatequina
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ER	Receptor de estrógenos
ERα	Receptor de estrógenos alfa
ERβ	Receptor de estrógenos beta
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FasL	Ligando del receptor Fas
Fig	Figura

g	Fuerza g
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
H₂DCF	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H₂DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
HMC1.1	Línea celular de mastocitos humanos
IFN-γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
IMDM	Medio de cultivo Dulbecco modificado de Iscove
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
i.p.	Intraperitoneal
KDa	Kilo Dalton
KIRs	Receptores inhibidores de los linfocitos NK
MC	Medio condicionado
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MTS	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio
NAC	N-acetil cisteína
Nf-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NK	Linfocitos citotóxicos naturales
nm	Nanómetro
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
ON	Óxido nítrico
PBS	Buffer fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PR	Receptor de progesterona
PR-A	Receptor A de progesterona
PR-B	Receptor B de progesterona
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa en tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Error estándar de la media

SFB	Suero fetal bovino
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TA	Temperatura ambiente
TBS	Buffer tris salino
TdT	Desoxinucleotidiltransferasa terminal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
T-HESC	Línea celular de células estromales endometriales humanas
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	Marcación de extremos 3'OH de ADN con desoxiuridinatrifosfato catalizada por la enzima TdT (del inglés, TdT-mediateddUTP Nick-EndLabelling)
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR2	Receptor de tipo 2 de VEGF
v.o	Vía oral
WG	Wogonina

1. Introducción

Definición y localización de la endometriosis

La endometriosis se define por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina predominantemente ubicado en la cavidad peritoneal. Este tejido se desarrolla en un sitio ectópico y forma lo que se conoce como lesiones endometriósicas. Se trata de una enfermedad inflamatoria, crónica y estrógeno dependiente ¹⁻³.

Las lesiones pueden estar constituidas por glándulas secretoras rodeadas de estroma celular, o bien, pueden estar conformadas sólo por estroma celular que puede ser compacto o laxo de acuerdo a la naturaleza histológica de la lesión ⁴. La endometriosis puede manifestarse a través lesiones en la superficie peritoneal, lesiones de infiltración profunda peritoneal, lesiones en el ovario y nódulos en el tabique rectovaginal. La endometriosis peritoneal se caracteriza por la presencia de implantes endometriales en la superficie peritoneal que pueden ser rojos, negros o blancos, los que representan distintos estadios de la evolución de la lesión. La endometriosis de infiltración profunda definida como la invasión en profundidad mayor a 5 mm se caracteriza por lesiones ubicadas en la zona retrocervical, los ligamentos uterosacos, el espacio rectovaginal y la vejiga. La endometriosis ovárica puede manifestarse a través de lesiones superficiales o a través de quistes de diversos tamaños, cuyo contenido característicamente presenta un aspecto achocolatado denso ^{3,5} (**Figura 1.1.**).

Asimismo, a nivel pelviano se pueden encontrar lesiones que comprometen otros órganos como recto, sigmoides, apéndice y uréter. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de lesiones endometriósicas en sitios ectópicos poco frecuentes como los pulmones, la pleura, y los intestinos ⁶.

Las lesiones endometriósicas responden a las hormonas femeninas y producen microangrados en el lugar en el que se encuentran ubicadas, produciendo inflamación, dolores y posteriormente cicatrices que adhieren los órganos entre sí, alterando la anatomía normal de la pelvis y su función reproductiva ^{7,8}.

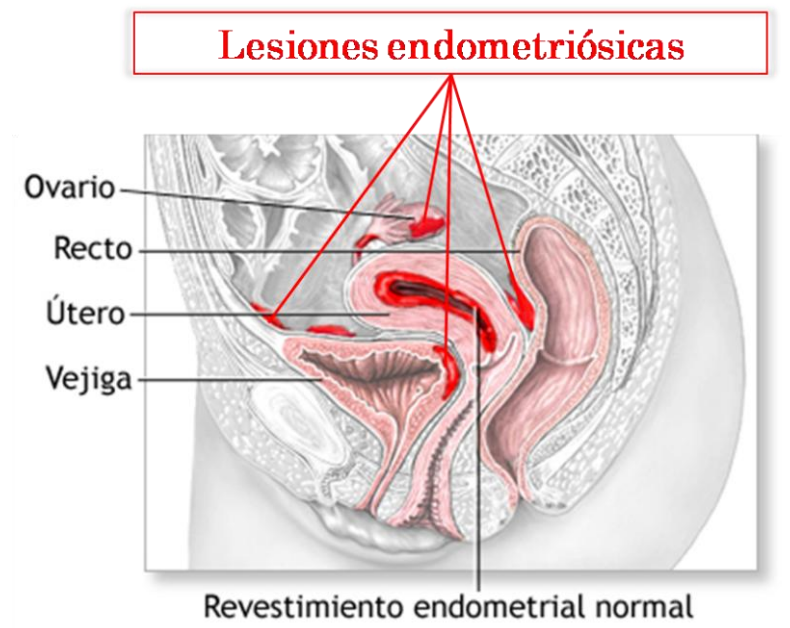


Figura 1.1.: Principales sitios ectópicos donde se localizan las lesiones endometriósicas
 Imagen modificada de: <http://aia5.adam.com/content.aspx?productId=118&pid=5&gid=000915>

Prevalencia de la endometriosis

Se estima que la endometriosis afecta aproximadamente al 10% de la población de mujeres en edad reproductiva ^{5,9,10} incrementándose la prevalencia hasta un 40% en las mujeres que presentan problemas de infertilidad ^{10,11} y hasta un 50% en las mujeres que además presentan una dismenorrea moderada a severa ¹¹. También existen casos aislados de mujeres postmenopáusicas y niñas prepúberes con anomalías uterinas que padecen esta enfermedad ^{12,13}.

Otro factor epidemiológico a considerar es la elevada tasa de recurrencia que presenta esta patología, que puede llegar a un 25% en los primeros 2 años e incrementarse a un 40-50% a los 5 años luego de finalizados los tratamientos ^{14,15}. Además, es importante mencionar que son cada vez más concluyentes los estudios que reportan un incremento significativo en el riesgo de desarrollar cáncer epitelial de ovario en las pacientes con endometriosis ovárica, principalmente carcinomas de tipo endometrioide y de células claras ^{16,17}.

Esta elevada prevalencia ha transformado a esta patología en un problema relevante de salud pública. Si bien Argentina no cuenta con datos estadísticos oficiales, la Sociedad Argentina de Endometriosis estima que aproximadamente un millón de mujeres padecen esta enfermedad. En Estados Unidos es la tercera causa

de internación ginecológica en mujeres adultas menores de 45 años de edad ¹⁸ y genera un costo anual en servicios de atención médica de aproximadamente unos 61,8 billones de dólares. Asimismo se ha reportado que en países europeos como Alemania, Reino Unido o Francia, la atención médica de las mujeres que padecen endometriosis representa un costo económico de similar magnitud ¹⁹.

Etiología de la endometriosis

La endometriosis fue descrita por primera vez como entidad patológica en el año 1860 por el patólogo Carl F. von Rokitansky ²⁰. A pesar del tiempo transcurrido todavía no se lograron dilucidar con certeza los mecanismos etiopatogénicos involucrados en el establecimiento y progresión de la enfermedad.

Diferentes teorías intentan dar explicación a los posibles orígenes de la endometriosis. Las más importantes se detallan a continuación:

Metaplasia celómica

Fue propuesta en 1919 por R. Meyer ²¹. Se fundamenta en el hecho que tanto el tejido endometrial como el tejido peritoneal y las células del epitelio superficial que recubren los ovarios se diferencian a partir de un tejido embrionario común: el epitelio celómico embrionario. En base a esto, Meyer propuso que la endometriosis se origina a partir de la membrana celómica mediante un proceso de transformación del tejido peritoneal o del epitelio ovárico, en tejido de tipo endometrial. Sin embargo, no se tiene en claro aún cuáles serían los factores que inducen dicha transformación metaplásica. Si bien no es la hipótesis más aceptada para explicar la formación de los diversos tipos de lesiones peritoneales, bien podría explicar la formación de las lesiones endometriósicas ováricas, también denominadas endometriomas ^{22,23}.

Propagación vascular

En la década de 1920 dos médicos patólogos J. Halban en 1924 ²⁴ y J.A. Sampson en 1927 ²⁵, propusieron en forma independiente una hipótesis que intentaba explicar la aparición de focos endometriósicos en sitios distantes de la cavidad peritoneal. Si bien la endometriosis es una enfermedad benigna, en dicha hipótesis postularon que células o fragmentos endometriales viables podrían ingresar a la circulación linfática o sanguínea y de esta manera propagarse, mediante el proceso conocido como metástasis, a sitios ectópicos distantes. Si bien esta hipótesis es

también cuestionada, podría explicar la formación de las lesiones endometriósicas en sitios anatómicos inusuales como el tórax, el cerebro o en las extremidades ^{23,25,26}.

Células madres progenitoras

Es la hipótesis propuesta más recientemente. En ella se considera el hecho en el cual el endometrio humano es un tejido dinámico que se somete a ciclos de crecimiento y regresión con cada fase menstrual. Las células madre progenitoras presentes en el útero son probablemente las responsables de esta notable capacidad regenerativa ²⁷. Pero también estas mismas células podrían originar lesiones endometriósicas si son diseminadas en la cavidad peritoneal mediante el flujo menstrual retrógrado ²⁸. Recientemente se publicó un estudio que aporta evidencia crucial para sustentar esta hipótesis, dado que en el mismo se ha corroborado la presencia de células madres endometriales en muestras de sangre menstrual de pacientes con endometriosis ²⁹. Pero, de acuerdo a esta teoría, no sólo las células madres progenitoras que residen en el útero pueden dar lugar a la formación de lesiones endometriósicas. También se ha postulado que las células madres mesenquimales pueden trasladarse por el torrente sanguíneo desde otros tejidos tales como la médula ósea, y bajo determinados estímulos tendrían el potencial de reprogramarse y diferenciarse en células endometriales que dan lugar a la formación de las lesiones endometriósicas, ya sea en la cavidad peritoneal como así también en sitios ectópicos inusuales ^{30,31}.

Teoría de la implantación de tejido endometrial por menstruación retrógrada

Esta hipótesis fue propuesta por J. A. Sampson en 1927 ³². La misma postula que las lesiones endometriósicas encontradas en la cavidad peritoneal se originan como resultado del flujo de tejido menstrual en sentido retrógrado a través de las trompas de Falopio, el cual transporta y disemina fragmentos endometriales en la cavidad peritoneal ³³. Estas células endometriales ectópicas tienen la capacidad de sobrevivir en el ambiente peritoneal, implantarse y proliferar en la superficie de diversos órganos o tejidos hasta formar una lesión endometriósica ²³ (**Figura 1.2.**).

De las cuatro teorías expuestas, la teoría de la implantación por menstruación retrógrada propuesta por Sampson es la más aceptada para explicar la presencia de

lesiones endometriósicas en la cavidad peritoneal. Se han reportado diversas evidencias que sustentan esta hipótesis, entre las cuales las más relevantes son:

- Aproximadamente el 90% de las mujeres en edad reproductiva presentan algún grado de menstruación retrograda, siendo común la observación de reflujo menstrual en la cavidad peritoneal ³⁴.
- Se han encontrado células endometriales viables en el líquido peritoneal de mujeres que padecen endometriosis ^{35,36}.
- Se ha corroborado experimentalmente que las células endometriales pueden implantarse y formar lesiones endometriósicas en la cavidad peritoneal de ratones hembra inmunosuprimidos ³⁷⁻³⁹.
- Se ha reportado un aumento de la incidencia de endometriosis en mujeres con obstrucciones anatómicas en las vías de salida del flujo menstrual ^{40,41}.

Es importante resaltar que si bien el flujo menstrual retrógrado es un fenómeno fisiológico normal en la mayoría de las mujeres ^{34,42}, sólo un 10% de las mismas desarrolla endometriosis. Por lo tanto el sólo hecho de encontrar tejido endometrial en la cavidad peritoneal no es suficiente para que una mujer desarrolle la enfermedad. Actualmente se sabe que los mecanismos etiopatogénicos de la endometriosis son muy complejos e involucran distintos procesos que se interrelacionan y coexisten en la cavidad peritoneal. Factores y condiciones de naturaleza hormonal e inmunológica sumados a las características intrínsecas del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis permiten a las células endometriales ectópicas evadir los sistemas de inmunovigilancia y sobrevivir en la cavidad peritoneal. Luego, son capaces de implantarse en un tejido u órgano, proliferar hasta convertirse en una lesión endometriósica y finalmente desarrollar su propia vasculatura para sustentarse ^{43,44} (**Figura 1.2.**).

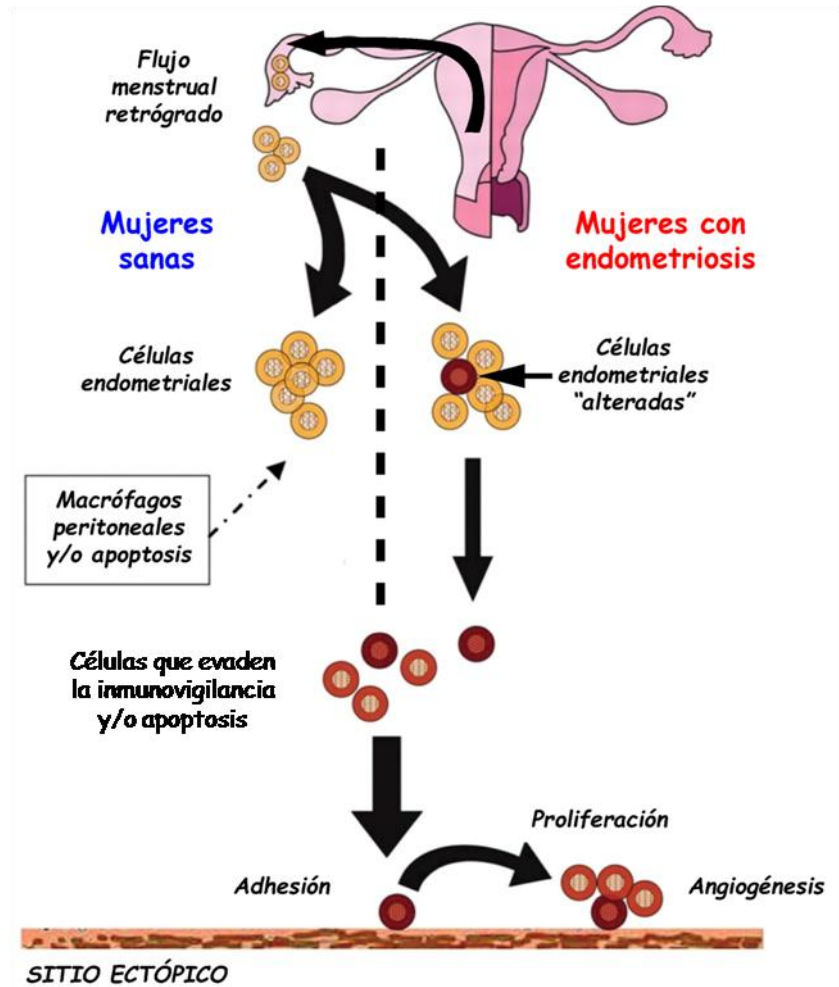


Figura 1.2.: Mecanismo simplificado que grafica la etiología de la endometriosis peritoneal.

Imagen modificada de: "The search for genes contributing to endometriosis risk". G. W. Montgomery y col. *Human Reproduction Update* 2008⁴⁵.

Sintomatología de la endometriosis

Si bien se conocen casos de pacientes asintomáticas, los principales síntomas comúnmente asociados a la endometriosis son el dolor pelviano y la infertilidad^{3,11,46}.

El dolor pelviano afecta generalmente a un 50-65% de las pacientes con endometriosis⁴⁶ y puede manifestarse en forma de dismenorrea (dolor menstrual atípico), dispareunia (dolor durante las relaciones sexuales) o como dolor crónico que puede ser moderado o severo. Si las lesiones se ubican sobre la vejiga o sobre el recto, pueden producirse episodios de disuria (dolor al orinar) o disquecia (dolor al defecar), respectivamente⁴⁷. Cualquiera sea la forma en que el dolor asociado a la

endometriosis se manifieste, interfiere sin duda alguna en el desempeño social de las mujeres afectadas, en sus relaciones familiares, como así también en su sexualidad y bienestar psicológico, perjudicando sustancialmente su calidad de vida ^{48,49}. Muchas veces el dolor es inhabilitante y requiere de internaciones. En consecuencia, las pacientes buscan asistencia en grupos de autoayuda de mujeres afectadas, así como en profesionales o en terapias alternativas que puedan ayudar a aliviar los intensos dolores con los que deben convivir.

Otro de los principales síntomas asociados a la endometriosis es la infertilidad la cual afecta a aproximadamente el 50% de las pacientes ^{8,50}. Los mecanismos fisiopatológicos responsables no se conocen aún con certeza ⁸ pero desde hace tiempo son objetivos de una activa tarea de investigación científica. La infertilidad provoca frustraciones en las pacientes con endometriosis que desean ser madres y esta situación muchas veces se agrava debido a que se someten a tratamientos de fertilización asistida largos e invasivos, los cuales no siempre resultan efectivos ⁵¹.

Algunas de las causas propuestas para explicar las causas de la infertilidad en mujeres con endometriosis son:

- Presencia de adherencias que causan distorsiones anatómicas o impedimentos mecánicos que imposibilitan la correcta fertilización del ovocito ⁵².
- Alteraciones inmunológicas, como el incremento en número y estado de activación de los macrófagos peritoneales, lo cual resulta en un aumento de la condición inflamatoria a nivel local que altera la función espermática o la supervivencia embrionaria ^{53,54}.
- Defectos de receptividad endometrial que provocan fallas en la implantación y/o calidad ovocitaria disminuida ^{55,56}.

Diagnóstico de la endometriosis

En lo que respecta al diagnóstico de esta patología, el mismo resulta ser un tanto complejo debido a la naturaleza no específica de los síntomas. Dolores pelvianos o infertilidad se suelen solapar con los síntomas de otras patologías como ser el síndrome inflamatorio pélvico o el síndrome de intestino irritable ^{57,58}.

Hasta el momento, el único diagnóstico certero se basa en la visualización directa de las lesiones endometriósicas mediante una cirugía translaparoscópica o laparotómica y el posterior examen anatómo-patológico de las biopsias para confirmar su entidad. Si bien algunas formas de la enfermedad pueden sugerirse mediante

técnicas diagnósticas no invasivas como son la ecografía o la resonancia magnética nuclear para el caso de endometriomas, implantes profundos retroperitoneales o lesiones ubicadas en el ligamento uterosacro, se han reportado casos de pacientes en las cuales estos mismos tipos de lesiones no fueron detectadas al utilizar esta tecnología^{58,59}. Es por eso que a pesar de la búsqueda constante de un método de diagnóstico no invasivo eficaz, aún hoy para confirmar la presencia de la enfermedad es necesario extirpar y evaluar histológicamente los implantes endometriósicos⁵.

Esta desventaja en el diagnóstico impulsa nuevas investigaciones basadas en la búsqueda de metodologías de evaluación alternativas a la intervención quirúrgica, como por ejemplo a través de la valoración de marcadores moleculares⁶⁰⁻⁶³. Sin embargo, hasta el momento estas herramientas de diagnóstico no se han estandarizado.

Es importante mencionar que la endometriosis es una enfermedad que está subdiagnosticada. La falta de un método de diagnóstico no invasivo y el criterio equivocado tanto de pacientes como de médicos ginecólogos en creer que el dolor pelviano intenso previo o durante el periodo menstrual es un evento normal, retrasa el estudio de sus causas y, por consiguiente, demora el diagnóstico de la enfermedad. En pacientes de 18 a 45 años, la demora promedio en el diagnóstico es de 6,7 años⁴⁹. Dado que en la mayoría de las mujeres con endometriosis el inicio de los síntomas ocurre durante la adolescencia y muchas veces se desestima, una temprana identificación de la enfermedad y la administración de un tratamiento adecuado, sin duda podrían mitigar el dolor, prevenir la progresión de la enfermedad, preservar la fertilidad y, en definitiva, mejorar la calidad de vida de las pacientes^{5,64-66}.

Clasificación de la endometriosis

La clasificación de la endometriosis fue establecida por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM por sus siglas en inglés) y plantea una categorización de la enfermedad en 4 estadios. La última actualización de esta sistematización se realizó en el año 1996⁶⁷ y si bien presenta algunas limitaciones, sigue siendo el sistema de clasificación utilizado en la actualidad⁶⁸.

Al momento de la laparoscopia exploratoria, se realiza una evaluación de la localización, tipo, tamaño y número de las lesiones así como de las adherencias que presenta la paciente. En base a estos datos, la ASRM estableció un sistema de puntuación ponderada que determina el grado de la enfermedad. De acuerdo a los

parámetros establecidos, la clasificación de la enfermedad resulta en cuatro estadios: estadio I o endometriosis mínima; estadio II o endometriosis leve; estadio III o endometriosis moderada y estadio IV o endometriosis severa. En la **Figura 1.3.** se muestra un esquema con la clasificación de la enfermedad.

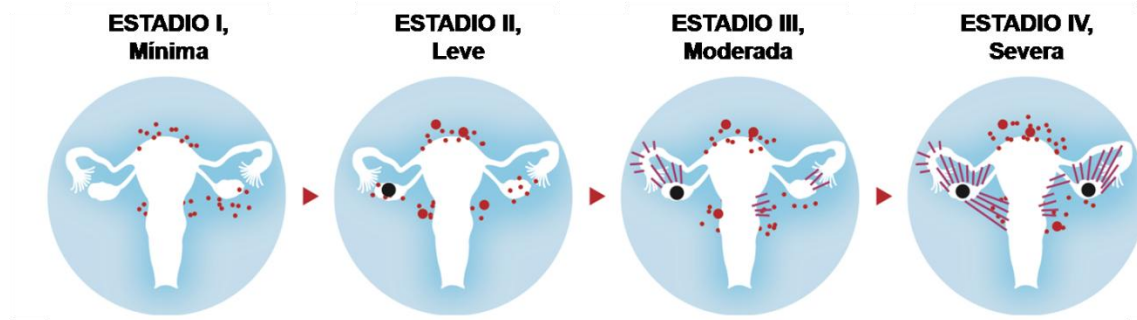


Figura 1.3.: Clasificación de la endometriosis

Imagen modificada de: <http://endometriosisweb.com/endometriosis-severa/>

Algunas de las limitaciones de esta clasificación comprenden la escasa correlación de los distintos estadios con los síntomas de la enfermedad, la baja capacidad de predicción de la tasa de embarazo posterior al tratamiento quirúrgico y el hecho de no describir adecuadamente la endometriosis profunda, entre otras. En los últimos años se han intentado proponer nuevos sistemas de clasificación que tengan en cuenta estas limitaciones y complementen satisfactoriamente el sistema definido por la ASRM pero aún no han podido ser implementados ⁶⁸.

Mecanismos fisiopatológicos de la endometriosis

Si bien se considera a la teoría de la menstruación retrógrada propuesta por Sampson como aquella que mejor podría explicar la presencia de células endometriales en la cavidad peritoneal, el hecho de que más del 90% de las mujeres presente flujo menstrual retrógrado pero sólo algunas desarrollen endometriosis da indicios de que existen otros factores involucrados en la etiopatogenia de esta enfermedad ³⁴. Estos factores, detallados a continuación, contribuyen sustancialmente a que los fragmentos de tejido endometrial diseminados en la cavidad peritoneal sobrevivan, implanten, invadan el peritoneo y proliferen hasta formar la lesión endometriósica ^{69,70}.

Características del endometrio eutópico de mujeres con endometriosis

El estudio del endometrio eutópico de las pacientes con endometriosis ha intentado arrojar luz sobre algunas de las características genéticas, bioquímicas y funcionales de sus células ^{71,72}. En la actualidad, sabemos que las mujeres que padecen de endometriosis presentan características diferenciales en el endometrio eutópico ^{73,74}, que sumadas a las alteraciones inmunológicas a nivel peritoneal, favorecen el establecimiento y crecimiento de las lesiones endometriósicas ^{53,54}.

Diversos estudios han demostrado que las pacientes con endometriosis presentan índices de apoptosis disminuidos en el tejido endometrial eutópico ⁷⁵⁻⁷⁸, que se acompaña por un aumento significativo en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, y una consecuente disminución de su contraparte proapoptótica Bax ^{79,80}. Estos trabajos sugieren la existencia de una predisposición de las células endometriales eutópicas a ser resistentes a la apoptosis, lo cual aumenta la susceptibilidad del tejido endometrial a sobrevivir en un sitio ectópico ⁸¹⁻⁸⁴.

El rol del sistema inmunológico

El sistema inmunológico está ampliamente involucrado en el desarrollo de esta enfermedad siendo en parte el responsable de la supervivencia de las células endometriales en sitios ectópicos. Se sugirió que en las mujeres con endometriosis, las células endometriales provenientes del reflujo menstrual no son reconocidas de manera eficiente por el sistema inmunológico ya sea debido a una incapacidad del mismo para responder a los antígenos endometriales, debido a que esos antígenos son anormales, o debido a que el reflujo es tan abundante que superan la capacidad de desafío de las células inmunitarias peritoneales ^{28,85}. Si bien es un tema complejo en abordar y aunque no es tema central de este trabajo de tesis doctoral, debido al importante rol del sistema inmunológico en la fisiopatología de la endometriosis, hemos decidido explicar brevemente la participación de los principales tipos celulares involucrados:

- **Macrófagos:** Los macrófagos constituyen la población de células inmunológicas más abundantes en el líquido peritoneal y en el endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis ^{86,87}. Los macrófagos tisulares que se encuentran infiltrando las lesiones endometriósicas muestran un incremento de su capacidad secretora liberando en la cavidad peritoneal una serie de factores inmunomoduladores como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) y la Prostaglandina E₂ (PGE₂), además de citoquinas proinflamatorias como Interleuquina (IL)-6, IL-1 β y el

Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α)^{7,88-90}. Estos factores promueven la adhesión de las células endometriales al peritoneo, la invasión del tejido ectópico y su proliferación, resultando de vital importancia en el proceso etiopatogénico de la enfermedad^{91,92}. Las células inmunológicas son reclutadas al sitio ectópico donde se establece la lesión, mediante la acción de factores quimiotácticos, como la Proteína Quimiotáctica de Monocitos secretada por las células endometriales y por los macrófagos activados^{93,94}. Sin embargo, aunque su capacidad secretora se encuentre incrementada, la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales se encuentra seriamente limitada debido a la disminuida expresión de algunos de los receptores de membrana que tienen a su cargo dicha función, como por ejemplo el receptor "scavenger" CD36^{95,96}. La deficiencia de los macrófagos en el reconocimiento y eliminación de las células endometriales ectópicas contribuye al establecimiento de las lesiones.

- **Células citotóxicas naturales (NK, natural killer en inglés):** Se trata de linfocitos citotóxicos efectores que pueden reconocer e inducir la lisis de células deletéreas^{97,98}. Se ha demostrado que las células NK de sangre periférica y las células NK peritoneales tienen una función citotóxica reducida en las mujeres con endometriosis⁹⁹. Si bien aún no se conocen completamente los mecanismos involucrados en la disminución de su funcionalidad, se sabe que los receptores denominados Receptores Inhibidores de las Células NK (KIRs) cumplen un rol fundamental. Se ha reportado que la expresión de KIRs en las células NK peritoneales de mujeres con endometriosis se encuentra incrementada en relación a mujeres controles¹⁰⁰⁻¹⁰². Otros autores consideran que la disminución en la funcionalidad de las células NK se debe a factores solubles presentes en el líquido peritoneal capaces de inhibir su actividad^{103,104}. Se ha visto que, por ejemplo, IL-6, IL-15 y TGF- β 1 desempeñan un papel crucial en la reducción de la actividad de las células NK en pacientes con endometriosis¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

- **Linfocitos:** La respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T citotóxicos, colaboradores y reguladores, además de los linfocitos B, tiene un papel importante en la fisiopatología de la endometriosis^{108,109}. Se ha reportado que la citotoxicidad de los linfocitos T contra las células endometriales autólogas se reduce significativamente en las mujeres con endometriosis en relación al grupo de mujeres control¹¹⁰⁻¹¹². Uno de los mecanismos probables involucrados en este fenómeno de escape inmunológico se basa en la expresión del ligando proapoptótico FasL por parte

de las células endometriósicas, el cual al unirse a su receptor Fas expresado por los linfocitos T citotóxicos induce la muerte por apoptosis de los mismos ¹¹³.

Mecanismos involucrados en la supervivencia de las células endometriósicas en un sitio ectópico

El principal mecanismo de crecimiento de las células endometriósicas en la cavidad peritoneal es mediado por las hormonas esteroideas, las cuales tienen un papel primordial en la patogénesis de la endometriosis ^{69,114}. Como se ha señalado anteriormente la endometriosis ha sido identificada como una patología dependiente de estrógenos ^{114,115}. En ese sentido, uno de los hallazgos más relevantes ha sido la detección de aromatasa P450, enzima responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos, en el tejido endometrial eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis ^{116,117}.

Para explicar la mayor predisposición de algunas mujeres a desarrollar endometriosis, varios estudios se han focalizado en las diferencias de expresión de los receptores hormonales entre el tejido endometrial eutópico y el ectópico ^{115,118}. Se hallaron polimorfismos tanto para los receptores de estrógeno (ER) ¹¹⁵ como para los de progesterona (PR) ^{119,120}, así como alteraciones en la expresión de PR-A y PR-B ¹²¹ en asociación con la endometriosis.

Estudios utilizando ratones con endometriosis ER $\alpha^{(-/-)}$ y ER $\beta^{(-/-)}$ y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos revelaron funciones esenciales de ambas isoformas del receptor de estrógeno en el desarrollo de lesiones endometriósicas ^{122,123}. Asimismo se reveló que ER α promueve la proliferación, la adhesión, la angiogénesis así como también modula la señalización de la inflamación en las lesiones ¹²⁴. Por su parte, ER β tiene un papel predominante en la supervivencia e invasión de las células endometriósicas ¹²⁵. Se reportó también que los niveles de ARNm del ER β se encuentran significativamente aumentados en las células endometriósicas comparado al endometrio eutópico normal ¹²⁶. Un trabajo publicado recientemente también reveló el rol predominante del ER β en el desarrollo de lesiones endometriósicas inducidas en ratón. Entre los mecanismos desarrollados por las células endometriósicas para evadir la vigilancia inmune se observó que el ER β inhibe la apoptosis inducida por el TNF α , promueve la proliferación y mejora la adhesión así como la capacidad invasiva de las células ¹²⁵.

Además, se ha reportado que los estrógenos estimulan la expresión y la actividad de ciclooxigenasa 2 (COX-2), y en consecuencia la síntesis de PGE₂, siendo

este último uno de los factores proinflamatorios característico de esta enfermedad^{127,128}. Por lo tanto se ha propuesto que la producción de estradiol en el tejido endometriósico induce un proceso de retroalimentación positiva dado que incrementa la transcripción de COX-2, la consecuente síntesis de PGE₂, y este último factor a su vez aumenta la expresión de la aromatasa P450. De esta manera, se mantienen los elevados niveles locales de estradiol, promoviéndose el crecimiento y supervivencia de las lesiones endometriósicas en el sitio ectópico^{114,129,130} (**Figura 1.4.**).

Por otro lado, está ampliamente aceptado que la progesterona contrarresta el efecto proliferativo que ejerce el estradiol en el endometrio secretor normal¹¹⁸ dado que induce la expresión de la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (17β-HSD-2), la cual convierte el estradiol en estrona, que es un estrógeno menos potente¹³¹. Sin embargo, se ha comprobado que en las lesiones endometriósicas la expresión de los genes diana regulados por la progesterona, como el de la enzima 17β-HSD-2, se encuentra sensiblemente reducida dado que la presencia de los receptores de progesterona en las células endometriósicas es prácticamente inexistente. Como consecuencia, se incrementan los niveles de producción de estradiol en las lesiones endometriósicas^{69,132} completándose así el ciclo de retroalimentación positiva esquematizado en la **Figura 1.4.**

El estrés oxidativo en la endometriosis

Se sabe que las especies reactivas del oxígeno (ERO) tienen un papel importante en la modulación de muchas funciones fisiológicas. Sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre la producción de ERO y la defensa antioxidante se produce lo que se conoce como estrés oxidativo, evento que ha sido ampliamente descrito en endometriosis¹³³⁻¹³⁶.

La principal causa del estrés oxidativo en endometriosis corresponde al desarrollo de un proceso inflamatorio crónico como consecuencia de la continua activación de macrófagos peritoneales y liberación de citoquinas proinflamatorias tales como IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α e interferón gamma (IFN-γ)^{7,137}. Complementariamente se vio que las mujeres con endometriosis presentan niveles significativamente más bajos de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en el líquido peritoneal siendo ambas componentes claves en el proceso de descomposición de radicales libres¹³⁸.

Se reportó además que la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) está sobre activada en macrófagos aislados de pacientes con infertilidad asociada a la endometriosis y liberan niveles superiores de óxido nítrico (ON) en comparación a las mujeres controles sin endometriosis ¹³⁹. Es conocido que el ON desempeña un papel fisiológico importante en los procesos reproductivos femeninos incluida la ovulación, la motilidad y la fertilización de los espermatozoides, la implantación, el embarazo y el parto ¹⁴⁰. La generación excesiva de ON por los macrófagos activados afecta negativamente la fertilidad al modificar la composición del entorno peritoneal y perjudicar la ovulación, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano ¹³³. Asimismo, el ON es capaz de reaccionar con el anión superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito ($OONO^-$) un potente agente oxidante capaz de dañar macromoléculas y promover la inflamación ¹⁴¹.

A su vez, el ON contribuye al crecimiento endometriósico e inflamación anteriormente mencionado promoviendo la síntesis de estradiol en las lesiones endometriósicas ya que es capaz de activar la COX-2; lo que a su vez, produce el incremento de los niveles de PGE_2 y aromatasa ¹⁴². El aumento resultante de estrógenos estimula la expresión génica de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) e iNOS cerrándose así el ciclo de retroalimentación positiva que mantiene la producción de ERO y contribuye a la inflamación local ¹⁴³ (**Figura 1.4.**).

Asimismo, otra causa desencadenante del aumento de ERO en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis es el aumento de los niveles de hierro ^{144,145} debido a la presencia de eritrocitos provenientes de la menstruación retrógrada o por hemorragias de lesiones preexistentes ¹⁴⁶. Se sabe que ciertos cationes metálicos como el hierro ($Fe^{2+/3+}$), contribuyen significativamente a la generación de ERO a través de la reacción de Fenton ¹⁴⁷. Por tal motivo, la sobrecarga de hierro promueve el estrés oxidativo y con ello la respuesta inflamatoria en endometriosis.

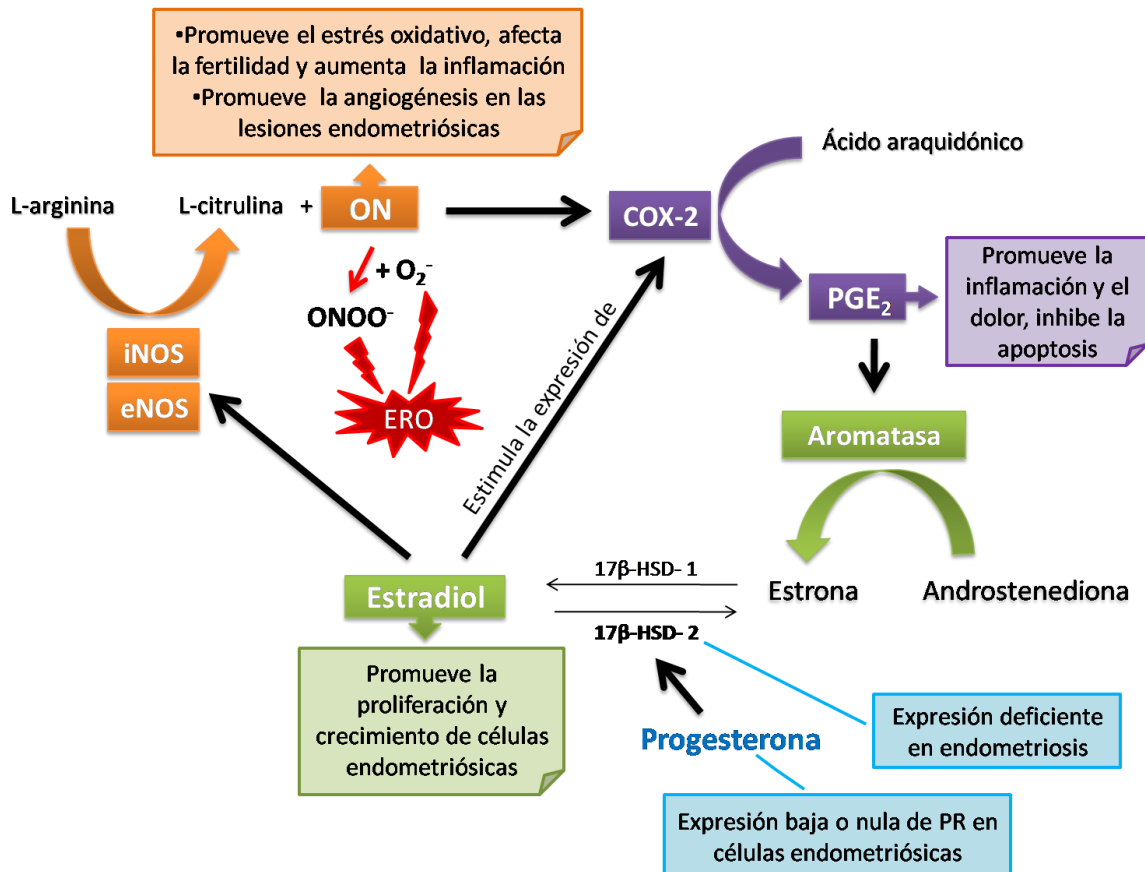


Figura 1.4.: Crecimiento y supervivencia de las lesiones endometrióticas en sitios ectópicos.

Se favorece gracias a un proceso de retroalimentación positiva que mantiene elevados los niveles locales de estradiol. El estradiol estimula la expresión de COX-2 de manera directa y también de manera indirecta induciendo la expresión de las enzimas iNOS y eNOS que sintetizan ON a partir de L-arginina. El ON además de estimular la expresión de COX-2 es capaz de reaccionar con el O_2^- para formar $OONO^-$, un potente agente oxidante que contribuye al estrés oxidativo. Como consecuencia al aumento de COX-2, se produce un incremento de los niveles de PGE_2 lo que promueve la inflamación y el dolor. A su vez, estimula la expresión de aromatasa, enzima encargada de convertir la androstenediona en estrona. Por último, debido a que los PR en las células endometrióticas son prácticamente inexistentes y la expresión de 17β-HSD-2 resulta ineficiente, la producción de estradiol en las lesiones endometrióticas se ve aún más favorecida.

COX-2: ciclooxigenasa 2; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; ON: óxido nítrico; O_2^- : anión superóxido; $OONO^-$: peroxinitrito; PGE_2 : prostaglandina E_2 ; PR: receptor de progesterona; 17β-HSD-2: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2; ERO: especies reactivas del oxígeno.

Resulta evidente entonces que el desequilibrio en el estado de óxido reducción es un actor fundamental tanto del desarrollo como de la progresión de la endometriosis y se postula que puede ser el blanco de nuevos enfoques terapéuticos para tratar e idealmente, para prevenir la recurrencia de la endometriosis ¹⁴⁸. Investigaciones llevadas a cabo estos últimos años reportaron los efectos de diferentes agentes antioxidantes naturales, como ser las vitaminas C y E; el resveratrol, un flavonoide abundante en las uvas y frutos rojos; polifenoles como el xanthohumol y el galato de epigallocatequina (EGCG), presentes en el lúpulo y en el té verde respectivamente; ente otros, en modelos experimentales de endometriosis. Todos ellos demostraron efectos positivos en lo que respecta a la inhibición del desarrollo y la progresión de la endometriosis en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que se resumen en el trabajo publicado recientemente por Harlev y col. ¹³⁶.

Sin embargo es importante mencionar que el uso de antioxidantes también puede resultar controversial en ciertas situaciones considerándose como un arma de doble filo ¹⁴⁹: si bien por un lado actuaría positivamente disminuyendo la inflamación crónica y evitando el desarrollo de un microambiente carcinogénico, por otro lado podría actuar negativamente al inhibir la apoptosis que se desencadena de manera fisiológica como consecuencia del aumento exacerbado de las ERO en las células endometriósicas ¹⁵⁰.

Dolor asociado a la endometriosis

Considerando que el intenso dolor pelviano es uno de los síntomas principales asociados a la endometriosis, se han realizado estudios a partir de los cuales se ha demostrado que la inervación neuronal de las lesiones endometriósicas tiene un papel relevante en la fisiopatología de esta enfermedad ^{151,152}. El número de fibras nerviosas identificadas en las lesiones endometriósicas es sustancialmente mayor que el observado en el tejido peritoneal de mujeres sanas ^{153,154}. Asimismo, el dolor relacionado con la endometriosis que típicamente se lo asocia a los niveles elevados de PGE₂, también podría ser causado por diversos agentes neuroactivos proinflamatorios como el factor de crecimiento nervioso (NGF) que sensibiliza los terminales de las fibras nerviosas sensoriales. En concordancia con esta afirmación, se demostró una alta expresión de NGF y su receptor en las lesiones endometriósicas ^{155,156}.

Además, si bien los mastocitos son conocidos por su participación en reacciones alérgicas ¹⁵⁷, existe evidencia de que también juegan un papel importante en la patogénesis del dolor crónico y neuropático en muchas condiciones patológicas, incluso en endometriosis ¹⁵⁸. Distintos trabajos han reportado que las lesiones endometriósicas humanas contienen un mayor número de mastocitos que los tejidos no afectados ¹⁵⁹⁻¹⁶³. También se demostró que el factor de células madre (SCF, también conocido como ligando kit), el principal factor de crecimiento, diferenciación y factor quimioattractante para los mastocitos, se encuentra aumentado en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis ¹⁶⁴. Este aumento fue más evidente en lesiones de infiltración profunda y en las proximidades de las fibras nerviosas ¹⁶⁵. Se ha encontrado además, que el dolor en la endometriosis profunda se correlaciona con una mayor infiltración de mastocitos cerca de terminaciones nerviosas periféricas, lo que sugiere un efecto directo de los mismos sobre la sensibilización periférica ¹⁶⁰. Debido a estos antecedentes, se cree que existe una retroalimentación positiva entre los mastocitos y las neuronas. Los mediadores secretados por los mastocitos, entre los que se incluyen histamina, TNF- α , triptasa, prostaglandinas, serotonina, IL-1 y NGF, son capaces de sensibilizar y/o activar a las neuronas nociceptivas primarias, mientras que los neurotransmisores, como la sustancia P o NGF, pueden desencadenar la degranulación de los mastocitos y promover la quimiotaxis ¹⁶⁶.

Por todo lo anteriormente detallado, se sugiere que la inhibición de la función de los mastocitos podría considerarse una nueva alternativa para tratar el dolor asociado a esta enfermedad ¹⁶⁶.

Terapéutica de la endometriosis

Actualmente no existen tratamientos capaces de curar por completo la endometriosis. Sin embargo, es posible tratar los principales síntomas que genera esta enfermedad y restringir transitoriamente el crecimiento de las lesiones endometriósicas. El éxito de los tratamientos es muy variable: pueden ser efectivos en mayor o menor medida en algunas pacientes o no producir beneficio alguno en otras ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. La estrategia terapéutica adoptada depende principalmente del tipo y gravedad de los síntomas a tratar, del interés de la mujer por lograr un embarazo, de su edad y de su historia clínica. También deberán considerarse los potenciales efectos secundarios no deseados que el tratamiento puede generar en la paciente ⁵⁸.

Tratamiento quirúrgico

Es el primer tratamiento de elección recomendado por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) ^{170,171}. Tiene como objetivo la remoción de los implantes endometriósicos visibles, y la eliminación de adherencias causadas por los mismos. En la mayor parte de los casos se lleva a cabo mediante una intervención laparoscópica ^{47,172}. Se recurre a esta estrategia terapéutica no sólo para evitar el continuo crecimiento de las lesiones, sino también para intentar reducir el dolor pelviano y el grado de infertilidad ⁶⁶. La localización de las lesiones endometriósicas es crítica, dado que la remoción quirúrgica de las mismas podría afectar por ejemplo la reserva ovárica en los casos de intervenciones por endometriomas o alterar la anatomía y funcionalidad de otros órganos como la vejiga o los intestinos ^{58,173}. La desventaja que presenta esta técnica quirúrgica es la dificultad a la hora de erradicar por completo las lesiones de tamaño microscópico. Debido a esto la posibilidad de recurrencia de la enfermedad puede llegar a un 25% en los primeros 2 años e incrementarse a un 40-50% a los 5 años de culminado el tratamiento ¹⁴. Es indispensable también la experiencia del médico cirujano interviniente quien debe poseer un entrenamiento adecuado, ya que algunas lesiones pueden pasar inadvertidas para el ojo inexperto. La infraestructura del centro médico es importante también. La realidad indica que en nuestro país muy pocos hospitales públicos cuentan con equipos de laparoscopia disponibles para estas prácticas en el Servicio de Ginecología.

Tratamiento farmacológico

Consiste en la administración de fármacos dirigidos a suprimir temporalmente el crecimiento de los implantes ectópicos, reducir la inflamación a nivel peritoneal y los síntomas de dolor, motivo por el cual en muchos casos este tipo de tratamiento se debe administrar a largo plazo. Estos medicamentos se suelen utilizar como terapia complementaria post-quirúrgica, y su elección por parte del médico depende del estadio de la enfermedad, del éxito de la cirugía en erradicar todas las lesiones visibles, de la edad de la paciente y de su deseo de concebir. Es importante destacar que estas estrategias terapéuticas promueven principalmente la inhibición de la síntesis de las hormonas ováricas o bloquean su acción en los tejidos donde estas hormonas desempeñan su función, por lo tanto retrasan la posibilidad de lograr un

embarazo hasta tanto se discontinúe su administración, con la problemática que esto conlleva a mujeres de edad avanzada deseosas de concebir ^{168,174,175}.

Los tratamientos hormonales incluyen los anticonceptivos orales y los análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, según sus siglas en inglés) como tratamientos de primera línea. También se utilizan progestágenos y, en menor medida, los agentes androgénicos.

Los anticonceptivos orales combinados, conformados por derivados de estrógenos y progestágenos (análogos funcionales de la progesterona), son utilizados en el tratamiento de la endometriosis ya sea en forma cíclica o continua, especialmente en mujeres jóvenes que no buscan un embarazo y/o que padecen grados variables de dismenorrea. También se los utiliza como método preventivo para evitar la recurrencia de la endometriosis en pacientes que han sido tratadas quirúrgicamente. Inhiben la ovulación, disminuyen los niveles de gonadotropinas y disminuyen el flujo menstrual ¹⁷⁶. Son utilizados en el tratamiento de esta patología por tener buena tolerancia, menor costo y menor impacto metabólico comparado a otros medicamentos ¹⁷⁶. Algunos efectos secundarios no deseados incluyen: sangrado irregular, ganancia de peso, hinchazón y dolores de cabeza ¹⁶⁷. Es importante tener en cuenta también, que los anticonceptivos orales combinados tienen un componente estrogénico y esto podría resultar en una estimulación de la enfermedad ¹⁷⁶. Además, los que se administran en forma cíclica, al permitir el sangrado, provocarían contaminación de la cavidad peritoneal con tejido endometrial y podrían estimular el crecimiento de los implantes endometriósicos ¹⁶⁷.

Otra opción terapéutica consiste en la administración de análogos de GnRH, los cuales tienen como función inhibir el eje endócrino hipotálamo-hipófisis-ovarios, interrumpiéndose de esta manera el ciclo menstrual y generando un consecuente estado hipoestrogénico que reduce la actividad metabólica de las lesiones endometriósicas y por consiguiente el dolor asociado a la endometriosis. Sin embargo, este tratamiento tiene efectos adversos considerables dado que la disminución de los niveles de estrógenos puede generar hipotrofia genital y/o la desmineralización del tejido óseo, entre otros efectos indeseadas, motivo por el cual no es recomendable administrarlo por periodos de tiempo mayores a 6 meses ^{3,175}.

Las progestinas constituyen otra opción terapéutica que también actúa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, suprimiendo la ovulación y disminuyendo los niveles de estrógenos en plasma ^{167,177}. Tienen efectos directos sobre el endometrio causando la atrofia tanto del tejido endometrial eutópico como de las lesiones endometriósicas ¹⁷⁸.

La eliminación del flujo menstrual, evitando la contaminación de la zona peritoneal y su buena tolerancia las posicionan como una alternativa apropiada si la paciente no busca el embarazo ¹⁷⁷. Si bien en los últimos años se ha propuesto en el mercado farmacológico a la progestina dienogest como un tratamiento específico para la endometriosis ^{179,180}, un estudio comparativo concluyó que este medicamento no resulta más beneficioso que otros progestágenos o que los anticonceptivos orales combinados ¹⁸¹. Además del sangrado irregular frecuente ¹⁸⁰, recientemente se reportó que dienogest administrado por 12 meses, provoca reducción de la densidad ósea ¹⁸².

Por último, los agentes androgénicos, como el danazol, inducen amenorrea suprimiendo el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, aumentando la concentración sérica de andrógenos y disminuyendo la de estrógenos ¹². Hace algunos años, varios estudios confirmaron la eficacia del danazol en el alivio de los dolores asociados a la endometriosis ¹⁸³⁻¹⁸⁵. Sin embargo, este compuesto tiene la desventaja de poseer propiedades anabólicas, lo que se traduce en efectos secundarios tales como ganancia de peso, mialgia, acné, piel grasa e hirsutismo ¹⁸⁶. Debido a estos indeseados efectos adversos, en la actualidad el uso de danazol para el tratamiento de endometriosis es limitado y ha sido reemplazado por las otras opciones terapéuticas mencionadas ¹⁶⁸.

Como terapia farmacológica complementaria, también suelen administrarse drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) para mitigar los dolores. Si bien se ha reportado que su mecanismo de acción se basa, en parte, en la inhibición de la síntesis de PGE₂ por medio de la inhibición de las enzimas COX ¹⁸⁷, su eficacia para tratar los dolores asociados a la endometriosis aún es materia de controversia ¹⁷⁵.

Asimismo, se han evaluado tratamientos farmacológicos alternativos, muchos de los cuales aún se encuentran en la fase experimental ^{168,169} como por ejemplo la administración de inhibidores de la enzima Aromatasa P450 ^{188,189}; inhibidores selectivos de la enzima COX-2 ¹⁹⁰; drogas que bloquean la acción del factor proinflamatorio TNF- α ^{174,175}; drogas antiangiogénicas como inhibidores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o agentes angioestáticos ^{191,192} y moduladores selectivos de los receptores de estrógeno ^{167,193}, entre otros.

Terapias alternativas: Las ventajas de los compuestos naturales

Como se detalló anteriormente, al día de hoy la endometriosis no cuenta con un tratamiento curativo sino que aquellos disponibles no hacen más que atenuar las consecuencias de la enfermedad sin atacar sus causas. Esto las hace poco efectivas,

ya que si bien producen mejoras temporales, al largo plazo traen arraigados efectos secundarios no deseados ^{168,176}. Dada esta situación, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes, que apunten al mecanismo etiopatogénico involucrado en la endometriosis y que acarreen menos efectos colaterales, es constante. Además, debido a la alta tasa de recurrencia observada al interrumpir el tratamiento hormonal ¹⁴, cada vez más se está pensando en buscar alguna alternativa terapéutica que pueda administrarse por plazos prolongados y que a su vez no comprometa al bienestar de la paciente, ni interfiera con la posibilidad de lograr un embarazo.

Las propiedades medicinales de las plantas han sido valoradas desde tiempos antiguos hasta nuestros días. Es por eso, que los productos de origen natural están siendo estudiados por sus propiedades medicinales en distintas patologías, entre ellas el cáncer y la endometriosis. Recientes avances en la investigación del cáncer se han centrado en el uso de extractos y compuestos bioactivos presentes en las plantas ¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. Asimismo nuestros y otros estudios en endometriosis respaldan la investigación de productos botánicos novedosos, potencialmente seguros y bien tolerados como agentes terapéuticos innovadores ^{136,198-200}.

El uso de compuestos naturales proporciona la posibilidad de administración a largo plazo con poca o ninguna toxicidad asociada a los pacientes ^{194,196}. Además, es bien sabido que compuestos naturales farmacológicamente activos pueden dirigirse a múltiples vulnerabilidades de las células cancerosas, sin toxicidad para las células normales ²⁰¹.

Hace algunos años nuestro grupo ha comenzado una búsqueda de posibles fitoterapéuticos para el control de la endometriosis, estudiando dos productos provenientes de los frutos rojos y del té verde, resveratrol y EGCG, respectivamente. Los resultados de estas investigaciones demostraron claros efectos inhibitorios de los compuestos naturales estudiados sobre el desarrollo de la endometriosis experimental ¹⁹⁹. La continuación de esta búsqueda, nos ha conducido a proponer el estudio de los compuestos bioactivos de dos especies vegetales con probados efectos terapéuticos beneficiosos en otras patologías: *Rosmarinus officinalis* y *Scutellaria baicalensis*.

Romero

El romero pertenece al género *Rosmarinus*, familia *Lamiaceae* y su nombre científico es *Rosmarinus officinalis*. Es una planta conocida y utilizada desde los tiempos más antiguos por sus propiedades medicinales con aplicaciones terapéuticas

para una amplia gama de enfermedades tales como trastornos respiratorios, problemas estomacales y enfermedades inflamatorias^{202,203}. Si bien no es nativa, se cultiva en nuestro país con éxito en la provincia de Córdoba, en la región de Cuyo y en el sur de la Argentina. En un trabajo de identificación de plantas medicinales utilizadas por los mapuches y tehuelches^{204,205} se reportó que el romero es usado por sus propiedades antiespasmódicas, antioxidantes, analgésicas, antiinflamatorias y antisépticas por estas comunidades nativas en el sur de Argentina y Chile. Asimismo, tradicionalmente es aceptado su uso para aliviar dolores durante el periodo y reducir el flujo menstrual²⁰³.

El extracto de hojas de romero está compuesto por aceites volátiles, flavonoides, polifenoles y terpenoides siendo el ácido carnósico y el ácido rosmarínico los compuestos bioactivos más abundantes. Por su estructura química, el ácido carnósico es un diterpeno fenólico y el ácido rosmarínico, un polifenol (**Figura 1.5.**). Ambos compuestos son los máximos responsables de la actividad antioxidante del arbusto²⁰⁶⁻²⁰⁹. Se demostró además que reducen la inflamación a través de la inhibición selectiva de COX-2, de la disminución de la producción de ON y de la inhibición de la expresión de IL-1 β y TNF- α ^{210,211}. Por otro lado, en lo que hace al control del dolor, los compuestos bioactivos del romero han demostrado poseer efectos antinociceptivos cuando fueron evaluados en distintos modelos *in vivo*^{212,213}.

Asimismo, se le han atribuido al romero funciones antitumorales^{207,210,211}. Estudios *in vitro* realizados en diversas líneas celulares han reportado que el ácido carnósico y el ácido rosmarínico inhiben la proliferación tumoral^{208,214-216}. Los mecanismos de acción de estos compuestos incluyen la regulación de la expresión de metaloproteinasas, la inhibición de la señalización intracelular de STAT3²¹⁷⁻²¹⁹ y la inducción de apoptosis a través de la vía intrínseca²¹⁹ o a través del control de la vía de Akt/IKK/Nf- κ B²²⁰. Además se ha reportado la inducción del arresto del ciclo celular mediante la degradación proteasomal de ciclinas y de importantes proteínas reguladoras del ciclo en cultivos primarios de glioblastomas humanos²²¹. Un análisis proteómico reciente realizado en células humanas de cáncer de colon reportó que el tratamiento con la fracción polifenólica del extracto de romero indujo la inhibición del crecimiento y la activación del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), el cuál regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes²²². Los efectos antitumorales también incluyen mecanismos antimetastásicos o antiinvasivos²²³ y antiangiogénicos^{214,224}. Derivados del romero incrementaron el efecto citotóxico del 5-fluorouracilo en diferentes líneas celulares de cáncer de colon. Este hallazgo es

muy promisorio debido a que estos biocompuestos lograron sensibilizar a células cancerígenas que se habían vuelto resistentes al tratamiento quimioterapéutico habitual ²²⁵.

Los estudios *in vivo* que sustentan los hallazgos inhibitorios del crecimiento tumoral se han realizado en modelos animales de cáncer de próstata ²²⁶ y cáncer colorectal entre otros ²²⁷. Además, Xu y col. comprobaron en un modelo animal de cáncer de pulmón que el ácido rosmarínico es antimetastásico ²²³. Hasta el momento no se reportaron ensayos clínicos realizados en pacientes que sufren de cáncer ni de endometriosis tratados con extractos o derivados del romero.

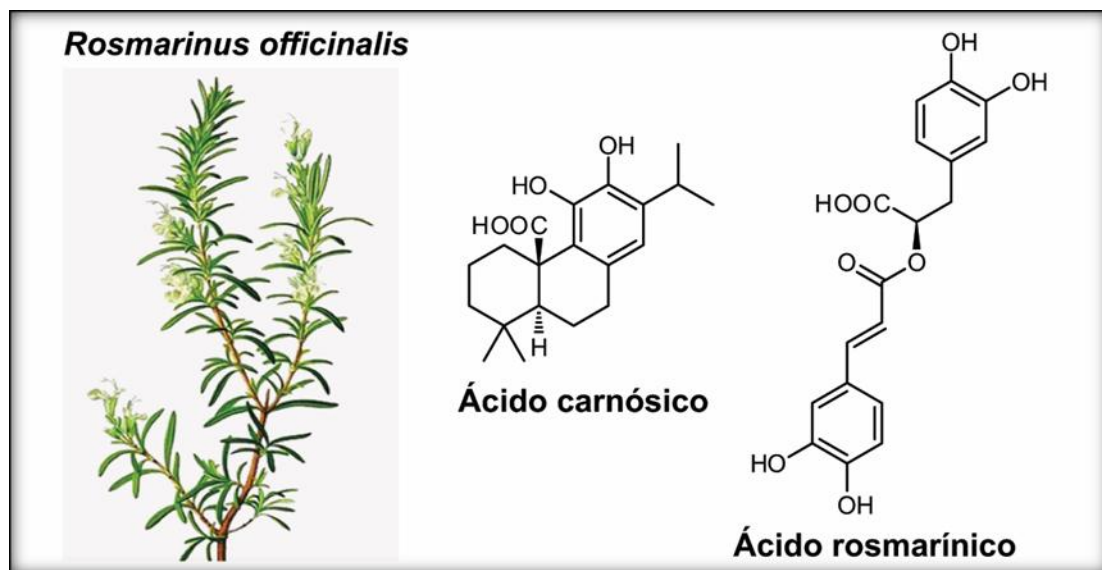


Figura 1.5.: Ácido carnósico y ácido rosmarínico.

Compuestos bioactivos presentes en las hojas del romero (*Rosmarinus officinalis*).

Imagen modificada de https://es.pngtree.com/freepng/rosemary-branches_1919949.html

Medicina herbaria china y Wogonina

La medicina china a base de hierbas (CHM) está siendo utilizada por millones de pacientes con endometriosis con excelentes resultados en el alivio de los síntomas y en el incremento de la fertilidad ²²⁸⁻²³². Estudios Cochrane confirmaron que los resultados de la utilización de este tipo de terapéutica, en cuanto al alivio de los síntomas y al éxito del embarazo, son comparables a la administración de gestrinona y mejores que los obtenidos con danazol ^{228,233}. La ventaja de la CHM sobre las mencionadas terapéuticas hormonales es que no provoca efectos adversos y aún más,

disminuye el dolor premenstrual y mejora los parámetros de fertilidad y la tasa de embarazos comparada a la medicina tradicional occidental ^{232,234}. A pesar de estos claros beneficios, no se conoce el modo de acción específico de esta combinación de hierbas. Dada la importancia que posee la fitomedicina probada por millones de pacientes con distintas dolencias en el continente asiático, son fundamentales los esfuerzos que se realicen por identificar moléculas activas responsables de los efectos benéficos de esta terapéutica.

Scutellaria baicalensis, conocida en China por su nombre Huang Qin, es una planta originaria del continente asiático, perteneciente al género *Scutellaria* y a la familia *Lamiaceae*. Es una de las hierbas fundamentales que componen la CHM, utilizada tradicionalmente para tratar enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, respiratorias e infecciones gastrointestinales ²³⁵. La raíz de esta planta contiene wogonina (**Figura 1.6.**), un flavonoide que constituye una de las principales moléculas bioactivas de la CHM ^{235,236}. Wogonina ha sido involucrada en procesos antitumorales, antiinflamatorios, antiproliferativos y proapoptóticos ^{236–239}. Se han identificado claras vías moleculares involucradas en la acción anticancerígena de wogonina ^{239–241}. Estudios *in vitro* en diferentes líneas tumorales demostraron que este flavonoide es capaz de controlar el crecimiento celular ²⁴². Algunos de los mecanismos involucrados en dicho control fueron reportados en diferentes trabajos científicos. Se observó que wogonina induce apoptosis en células T malignas ²⁴³, inhibe el crecimiento de células de cáncer de ovario resistentes a paclitaxel y carboplatino a través de la modulación del ciclo celular y apoptosis ²⁴⁴, induce apoptosis en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón ²⁴⁵, induce apoptosis y arresto del ciclo celular de líneas celulares de cáncer colorectal y cáncer de mama ^{246,247}, posee efectos antitumorales en cáncer de mama ^{248,249} y potencia los efectos del 5-fluorouracilo en células de cáncer gástrico ²³⁷. En modelos *in vivo* se observó que wogonina inhibe el crecimiento de leucemia de células T ²⁴³ y de cáncer de mama ER positivos y negativos ²⁴⁸, entre otros. Asimismo, wogonina inhibe la angiogénesis tumoral a través de la supresión de PI3K/AKT/NFκB ²⁵⁰ y a través de la inhibición de la fosforilación del receptor de tipo 2 de VEGF (VEGFR2) ²⁵¹. Su efecto antiinflamatorio fue comprobado en diversos trabajos científicos que revelaron su acción en la inhibición de la expresión de COX-2 y de la producción de PGE₂ ^{238,252}. A pesar de que se han realizado ensayos clínicos que evalúan la eficacia de la CHM en el tratamiento adyuvante del cáncer combinados con quimioterapéuticos con resultados promisorios ^{253,254}, hay una clara necesidad de programar ensayos clínicos bien controlados y prospectivos para sacar conclusiones valederas. Asimismo, es necesario identificar a los componentes biológicos

responsables de esta actividad. Lo mismo ocurre en el caso de la endometriosis, ya que a pesar de que conocemos los efectos benéficos de la CHM en su tratamiento, los mecanismos directos de las moléculas bioactivas de esa combinación de hierbas en la inhibición del crecimiento de las lesiones endometriósicas no han sido investigados.

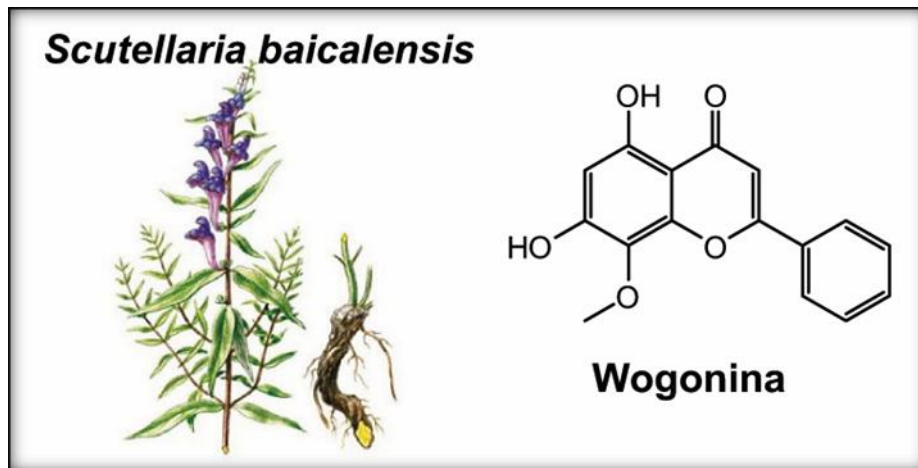


Figura 1.6.: Wogonina.

Flavonoide presente en la raíz de *Scutellaria baicalensis* y principal molécula bioactiva de la Medicina China a base de Hierbas.

Imagen modificada de <https://www.navratkuzdraviu.sk/files/-3.jpg>

Por tal motivo, proponemos evaluar la función de wogonina, del ácido rosmarínico y del ácido carnósico provenientes del romero, en la posible inhibición del desarrollo de la endometriosis y los mecanismos involucrados en dichos efectos.

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

En base a los antecedentes mencionados en la introducción planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

El ácido carnósico, el ácido rosmarínico y la wogonina controlan el crecimiento endometrial en modelos de endometriosis a través de la regulación de mecanismos involucrados en la fisiopatología de la enfermedad.

Para verificar estas hipótesis se detalla a continuación el objetivo general y los objetivos específicos del trabajo.

Objetivos

Objetivo general

La problemática de la terapéutica habitual de la endometriosis se basa en que los tratamientos disponibles en la actualidad no controlan las causas de la enfermedad sino que sólo mejoran sus síntomas. En consecuencia, si el tratamiento se interrumpe son muy frecuentes los casos de reincidencia lo que termina dificultando aún más el control definitivo de la enfermedad.

Es nuestra intención aportar evidencia experimental relevante que contribuya al conocimiento de los beneficios que aporta el uso de compuestos naturales como estrategias novedosas para la terapéutica de la endometriosis. Nuestro interés se fundamenta en la necesidad de un tratamiento más efectivo, con compuestos que inhiban los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad y que potencialmente puedan ser administrados por periodos prolongados sin perjudicar la salud de las pacientes y sin interferir sobre la posibilidad de lograr un embarazo exitoso. Por tal motivo, planteamos el siguiente objetivo general:

Evaluar el efecto de tres compuestos naturales, ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG), sobre el desarrollo de la endometriosis en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Este objetivo se encuadra dentro de los esfuerzos realizados desde hace varios años por el laboratorio donde realicé este trabajo de tesis doctoral, cuyo interés es además de develar los mecanismos involucrados en la etiopatogenia de la endometriosis, buscar estrategias terapéuticas más eficientes para tratar a las mujeres afectadas por esta patología. En particular la búsqueda de alternativas terapéuticas naturales, ha sido el impulsor de este trabajo.

En base a lo establecido en el objetivo general, planteamos los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

- a. Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre la proliferación de cultivos primarios de células estromales endometriales provenientes de pacientes con endometriosis y mujeres controles, y sobre la línea celular estromal endometrial humana T-HESC.
- b. Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre el ciclo celular de las células T-HESC y sobre proteínas involucradas en la regulación del mismo.
- c. Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre la apoptosis de la línea celular T-HESC.
- d. Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre la generación de especies reactivas del oxígeno en células T-HESC.
- e. Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre la expresión proteica de los receptores de estrógeno y la secreción de estradiol de células T-HESC.

Siendo el dolor pelviano uno de los síntomas más preocupantes de la endometriosis y dada la evidencia del rol que cumplen los mastocitos en patologías que involucran inflamación crónica y dolor neuropático decidimos:

- f. Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular de mastocitos utilizando la línea celular humana HMC1.1.

Para complementar estos estudios realizados *in vitro*, quisimos probar el efecto de estos compuestos en un modelo experimental murino de endometriosis internacionalmente aceptado para el estudio de esta patología. Siendo así, consideramos:

- g.** Evaluar el efecto de la terapéutica con AC, AR y WG sobre el desarrollo de lesiones endometriósicas inducidas en el modelo *in vivo* de endometriosis experimental.
- h.** Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre la proliferación de las células estromales y epiteliales en las lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón.
- i.** Evaluar el efecto de AC, AR y WG sobre la apoptosis de las células estromales y epiteliales en las lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón.

3. Materiales y métodos

Modelos experimentales

En este trabajo utilizamos distintas estrategias experimentales para el estudio de la endometriosis. Se emplearon modelos *in vitro* e *in vivo*, complementarios entre sí, como herramientas experimentales para poder responder las distintas preguntas planteadas.

Uno de los modelos *in vitro* consistió en cultivos primarios de células estromales endometriales realizados a partir biopsias de endometrio de pacientes con endometriosis y de mujeres controles tomadas de rutina por médicos durante laparoscopias diagnósticas. Si bien trabajar con muestras de pacientes proporciona una gran ventaja desde el punto de vista experimental y desde la proyección de los resultados, también resultan evidentes las dificultades que eso conlleva como ser la escasez de muestras con las que contamos, la dificultad del procesamiento, aislamiento y mantenimiento de las células, como así también la dispersión de datos que se obtienen.

Frente a estas dificultades, la investigación científica recurre a la utilización de modelos *in vitro* de líneas celulares establecidas. En endometriosis, tanto nuestro grupo como distintos equipos de investigación utilizamos la línea celular endometrial humana T-HESC como modelo experimental, dada su versatilidad y similitud con el tejido endometrial humano²⁵⁵⁻²⁵⁷. Asimismo, parte del trabajo se ha realizado con la línea de mastocitos humanos HMC1.1, modelo que nos ayudó a validar mecanismos mediante los cuales los compuestos evaluados impactan sobre el crecimiento celular. Las líneas celulares poseen la ventaja de la practicidad en cuanto al manejo y a la reproducibilidad de los resultados.

Por otro lado, los modelos animales proporcionan una herramienta muy importante para el estudio de las patologías humanas. En medicina experimental permiten investigar las bases moleculares de las enfermedades, estudiar la fisiopatología de las mismas así como también evaluar nuevas terapias. El modelo murino de endometriosis experimental que utilizamos en este trabajo se fundamenta en la inducción de lesiones endometriósicas a través de la colocación de tejido uterino autólogo en un sitio ectópico como es el intestino. Este modelo está ampliamente aceptado para el estudio de esta enfermedad²⁵⁸⁻²⁶⁰ y ha sido utilizado en trabajos

previos realizados en nuestro laboratorio publicados en revistas internacionales ^{199,261,262}. Todos los procedimientos se hicieron bajo las Normas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH) de los Estados Unidos. El procedimiento quirúrgico, así como las vías de administración, han sido evaluados y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IBYME.

Experimentos *in vitro*

Biopsias de endometrio de pacientes con endometriosis y mujeres control

Se obtuvieron biopsias de endometrio de mujeres en edad reproductiva, que se sometieron a laparoscopias diagnósticas y/o terapéuticas en el Instituto Argentino de Diagnóstico y Tratamiento (IADT), ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Estas biopsias fueron tomadas de rutina con la finalidad de realizar su evaluación anatómo-patológica, y parte de ese material fue derivado a nuestro laboratorio en condiciones de esterilidad para su posterior procesamiento. El médico a cargo de realizar las intervenciones quirúrgicas fue el Dr. José Javier Singla (MN: 74001 / MP: 221334). En todos los casos se obtuvieron los consentimientos informados firmados por cada una de las participantes del estudio. Tanto el consentimiento informado como los protocolos experimentales que involucran el uso de muestras humanas fueron debidamente evaluados y avalados por el IADT y por el Comité de Ética del IBYME-CONICET.

Se utilizaron biopsias endometriales de pacientes con endometriosis (estadios II, III y IV según la clasificación establecida por la ASRM ⁶⁷ y biopsias endometriales de mujeres que no padecían esta enfermedad pero que se sometieron a laparoscopias diagnósticas por infertilidad, obstrucción de trompas u otra patología de origen no infeccioso ni oncológico (grupo control). En todos los casos las pacientes no recibieron tratamiento hormonal durante los seis meses previos a la intervención quirúrgica.

Aislamiento y cultivo primario de células estromales de endometrio humano

Las biopsias de endometrio se lavaron con medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen) suplementado con una solución de antibiótico-antimicótico (AA: penicilina,

estreptomomicina y anfotericina B, Gibco, Invitrogen). A continuación se cortó el tejido en fragmentos pequeños que se incubaron con 0,5 mg/ml de colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 37°C. La suspensión celular resultante se centrifugó a 100 xg durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante enriquecido de células estromales en un tubo cónico de 50 ml; el sedimento se resuspendió con medio de cultivo y se centrifugó nuevamente a 100 xg durante 5 minutos. A esta velocidad de centrifugación, la fracción enriquecida de células epiteliales queda retenida en el sedimento y la fracción enriquecida de células estromales, en el sobrenadante. Para continuar purificando las células estromales, se combinaron los sobrenadantes resultantes de ambas centrifugaciones en una única suspensión que se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos. El sedimento celular resultante, enriquecido en células estromales, se resuspendió con medio de cultivo y se filtró a través de un filtro de nylon con poros de 40 µm de diámetro (BD Biosciences) capaz de retener los cúmulos de células epiteliales. Para culminar la purificación, la suspensión celular filtrada se centrifugó nuevamente a 400 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células estromales en 1 ml de medio con AA suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Invitrogen) (medio completo). Para calcular el número de células en la suspensión, se realizó una dilución en ácido acético 3% que elimina los glóbulos rojos que pueda haber en la muestra y se determinó el número de células contando en una cámara de Neubauer.

Evaluación de la proliferación celular de cultivos primarios

Se sembraron 2×10^4 células estromales endometriales provenientes de biopsias de endometrio de pacientes con endometriosis y de mujeres del grupo control (cultivos primarios) en placas de 96 pocillos (Corning™ Costar™). Se incubaron por 24 horas a 37°C en estufa gaseada en medio completo y luego se estimularon por 24 horas con diferentes dosis de cada compuesto en condiciones de hambre (1% SFB): ácido carnósico (AC, Alexis biochemicals): 0; 2,5; 5; 7,5; 10 µg/ml, ácido rosmarínico (AR, Enzo Life Sciences): 0; 25; 50; 100 µg/ml y wogonina (WG, Sigma-Aldrich): 0; 20; 40; 80 µM. Los basales fueron incubados únicamente con el vehículo en el que se disolvieron los compuestos: dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) 0,8% para AC y WG y buffer fosfato salino (PBS) para AR. La proliferación celular se evaluó utilizando el kit Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) como se describió previamente¹⁹⁹. Brevemente esta técnica se basa en la reducción metabólica del MTS, (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-

sulfofenil]-2H-tetrazolio), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para producir un compuesto de color amarillo (formazán) soluble en el medio de cultivo, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células. Este método es muy utilizado para evaluar supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido. Dos horas antes de finalizar con el tiempo de estimulación se agregaron 20 μ l de MTS por pocillo, se esperó a que reaccionara el color y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro de placas (Labsystem Multiscan). Se tomaron los valores promedios correspondientes a 4 réplicas por condición experimental. Los resultados se expresaron como porcentaje del basal, media \pm SEM.

Cultivo de la línea celular estromal endometrial humana T-HESC

T-HESC (ATCC CRL-4003) es una línea celular no tumoral tipo fibroblástica, inmortalizada con telomerasa transcriptasa inversa desarrollada a partir de células de endometrio de una paciente con miomas benignos. Las células T-HESC se mantuvieron en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories) y los antibióticos estreptomycin 100 μ g/ml y penicilina 100 UI/ml (Sigma) (medio completo). Las células se cultivaron en frascos de 25 o 75 cm^2 y se incubaron bajo condiciones de esterilidad en estufa a 37°C con 5% CO_2 hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente 70-90%, momento en el cual se subcultivaron y se utilizaron para los experimentos detallados más adelante.

Evaluación de la proliferación de células T-HESC

Se sembraron 5×10^3 células T-HESC por pocillo en placas de 96 pocillos. Se incubaron por 24 horas a 37°C en estufa gaseada en medio completo y luego se estimularon por 24 horas con diferentes dosis de cada compuesto en condiciones de hambreado: AC 0; 7,5; 10; 12,5 y 25 μ g/ml, AR: 0; 25; 50; 100 μ g/ml y WG: 0, 20, 40, 80 y 160 μ M. Los basales fueron incubados únicamente con el vehículo en el que se disolvieron los compuestos. La proliferación celular se evaluó utilizando el kit Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Se tomaron los valores promedios correspondientes a 3 réplicas por condición experimental. Los resultados se expresaron como porcentaje del basal, media \pm SEM.

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo en células T-HESC

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células T-HESC por pocillo en placas de 6 pocillos (Corning) y se incubaron por 24 horas a 37°C en estufa gaseada en medio completo. Luego se estimularon por 48 horas con diferentes dosis de cada compuesto en condiciones de hambreado: AC: 0; 2,5; 5 $\mu\text{g/ml}$; AR: 0; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$ y WG: 0; 40; 80 μM . Al cabo de estos tiempos las células se levantaron con 0,25% tripsina (Gibco), se frenó la reacción con medio de cultivo suplementado con 10% SFB y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 130 xg. Además, se recolectaron y centrifugaron los sobrenadantes para incluir en el análisis aquellas células que luego del tratamiento se despegaron de la placa. Ambos sedimentos se juntaron, se realizó un lavado con PBS y luego las células se fijaron en etanol 70% frío agregado lentamente mientras se agitaba el tubo. Las células se mantuvieron a -20°C hasta el día del análisis por citometría de flujo. Para ello primeramente se centrifugaron durante 5 minutos a 130 xg, el pellet resultante se incubó con 3 μl de una solución 50 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio (Sigma) durante 15 minutos en oscuridad y por último se resuspendió en 300 μl de PBS para luego ser evaluadas en el citómetro (FACS Canto II, BD Biosciences). Se tomaron 10000 eventos para cada condición. Los resultados se analizaron utilizando el programa informático Cyflogic1.2.1 (Cyflogic). Todos los tratamientos fueron comparados con la condición basal que fue estimulada sólo con vehículo. Este mismo ensayo fue utilizado para calcular el porcentaje de células con contenido de ADN subdiploide (fase sub-G1), lo que sirvió para estimar la presencia de células muertas luego de los tratamientos (protocolo modificado de Cattaneo y col.)²⁶³.

Evaluación de la apoptosis en células T-HESC

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células T-HESC por pocillo en placas de 6 pocillos. Se incubaron por 24 horas a 37°C en estufa gaseada en medio completo y luego se estimularon por 24 y 48 horas en condiciones de hambreado con AC: 0; 5; 25 $\mu\text{g/ml}$, AR: 0; 100 $\mu\text{g/ml}$, y WG: 0; 80 μM .

Al cabo de estos tiempos las células se levantaron con 0,25% tripsina, se frenó la reacción con medio de cultivo suplementado con 10% SFB y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 130 xg. Además, se recolectaron y centrifugaron los sobrenadantes para incluir en el análisis a aquellas células que luego del tratamiento se despegaron de la placa. Para cada una de las condiciones, se juntaron ambos sedimentos, las células se fijaron en 2% paraformaldehído (Sigma) en PBS y se guardaron a 4°C hasta su evaluación.

Se utilizó la técnica de marcación del extremo libre del ADN con nucleótidos acoplados a fluoresceína por medio de la enzima transferasa de nucleótidos (TdT-mediated dUTP-fluorescein Nick-End Labelling, TUNEL) para evaluar los niveles de apoptosis. La técnica se fundamenta en la localización y marcación de los extremos 3'-OH que se generan por la fragmentación del ADN en las células apoptóticas ²⁶⁴. Para ello, se utilizó el kit de detección de la apoptosis In Situ Cell Death (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describió previamente ¹⁹⁹. Brevemente, las células se lavaron con PBS para quitar el fijador y se permeabilizaron durante 2 minutos con una solución 0,1% tritón X-100 (Anedra) - 0,1% citrato de sodio (Sigma) en hielo. Luego de lavar nuevamente 2 veces con PBS se procedió a la incubación de las células con la enzima TdT y los nucleótidos acoplados a fluoresceína durante 1 hora a 37°C. Al finalizar la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en PBS fresco para realizar el pasaje de las mismas por el citómetro de flujo. Se analizaron 10000 eventos en cada caso. Los datos obtenidos por el programa del equipo se analizaron posteriormente con el programa informático Cyflogic1.2.1. Se realizaron todos los controles pertinentes: el de autofluorescencia de las drogas para utilizar en la compensación del citómetro; el control positivo (células Jurkat estimuladas durante 24 horas con 1 µM de estaurosporina (Sigma)) y el control negativo (células Jurkat estimuladas a las que se les realizó la técnica de TUNEL en ausencia de la enzima TdT).

Evaluación de la expresión proteica por Western blot en células T-HESC

Se sembraron 2×10^5 células T-HESC por pocillo en placas de 6 pocillos. Se incubaron durante 24 horas a 37°C en estufa gaseada en medio completo, luego se estimularon durante 48 horas en condiciones de hambreado con AC: 0; 2,5; 5 µg/ml, AR: 0; 50; 100 µg/ml, y WG: 0; 40 y 80 µM. Las células se levantaron raspándolas con un rastrillo a 4°C en buffer lisis (Tris HCl 50 mmol pH 7,5, EDTA 1 mmol, EGTA 1 mmol, NaCl 150 mmol, glicerol 10%, NP40 1% MgCl₂ 1 mmol, SDS 0,1%) con 1:500 de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) y se guardaron a -70°C.

Al momento de realizar la cuantificación de proteínas, se descongelaron las muestras, se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 16000 xg, se separó el sobrenadante y se descartó el sedimento. Se cuantificó la concentración de proteínas presentes en el sobrenadante mediante la técnica de Bradford utilizando patrones de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) ²⁶⁵.

De cada muestra se tomó una alícuota conteniendo 30 o 50 µg de proteínas y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% durante aproximadamente 90 minutos a 150 V constantes. Se transfirieron las bandas proteicas resultantes a una membrana de nitrocelulosa de 2 µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences). Se trató la membrana con una solución de leche descremada 5% en buffer tris salino (TBS) con 0,1% de tween-20 (TBS-T) para bloquear el pegado inespecífico y se incubó con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Los productos proteicos se identificaron con los anticuerpos primarios detallados en la **Tabla 3.1.** mediante procedimientos estándar de Western blot.

Anticuerpo primario	Dilución	Marca
Cdc2 p34 (PSTAIRE) (CDK1) (conejo)	1:750 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
Ciclina B1 (GNS1) (ratón)	1:200 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
ERα (MC-20) (conejo)	1:250 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
ERβ (ab-3576) (conejo)	1:500 (1% leche TBST 0,1%)	Abcam
ERβ (B-1) (ratón)	1:500 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
ERβ (1531) (ratón)	1:250 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz
GAPDH (14C10) (conejo)	1:10000 (TBST 0,1%)	Cell Signaling
P21 (F-5) (ratón)	1:250 (1% leche TBST 0,1%)	Santa Cruz

Tabla 3.1.: Anticuerpos primarios utilizados para la detección proteica por la técnica de Western blot.

En la primera columna se indica el anticuerpo y entre paréntesis, el clon y el origen. En la segunda columna se detallan las condiciones de las diluciones realizadas.

Luego de la incubación se realizaron seis lavados por 5 minutos cada uno con TBST 0,1%. Los anticuerpos secundarios correspondientes, detallados en la **Tabla 3.2.**, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) en TBST 0,1%. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos en TBST 0,1% y un lavado de 5 minutos en TBS. La visualización de las bandas se realizó por quimioluminiscencia, incubando las membranas durante 1 minuto con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (Pierce). Se adquirieron las imágenes de las bandas en un equipo de revelado digital (G-Box, SynGene). La cuantificación se realizó mediante el análisis densitométrico de las bandas, utilizando el software ImageJ (NIH), normalizadas con la expresión de

GAPDH en cada calle. Los datos se expresaron como porcentaje del basal, media \pm SEM.

Anticuerpo secundario	Dilución	Marca
Anti IgG de conejo	1:2000 (TBST 0,1%)	Sigma
Anti IgG de ratón	1:2000 (TBST 0,1%)	R&DSystems

Tabla 3.2.: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección proteica por la técnica de Western blot.

Los anticuerpos secundarios utilizados están acoplados a peroxidasa para su posterior revelado por quimioluminiscencia.

Determinación de especies reactivas del oxígeno en células T-HESC

Se sembraron 6×10^3 células T-HESC por pocillo en placas negras de 96 pocillos con fondo transparente (BD Falcon). Se incubaron 24 horas a 37°C en estufa gaseada en medio completo y luego se estimularon en condiciones de hambreado con AC: 0; 2,5; 5; 7,5; 10 $\mu\text{g/ml}$, AR: 0; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$ y WG: 0; 40; 80 μM . Se incluyó además un tratamiento con N-acetil cisteína (NAC), un compuesto con probados efectos antioxidantes. En este caso las células se pre-estimularon durante 1 hora con NAC (5 mM) y luego se adicionó WG 80 μM .

Después de 24 horas de tratamiento, los medios condicionados se removieron y las células se incubaron con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, 10 μM , Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C. Esta molécula no fluorescente difunde libremente a través de las membranas celulares y en el interior celular es blanco de desacetilasas celulares. Una vez desacetilado, el producto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF), es incapaz de atravesar la membrana y permanece en el interior de la célula. En presencia de especies reactivas del oxígeno (ERO, principalmente peróxido de hidrógeno, radicales peroxilo y peroxinitrito), H_2DCF es oxidada convirtiéndose en un compuesto altamente fluorescente (2',7'-diclorofluoresceína, DCF). Para el control positivo, las células fueron estimuladas con peróxido de hidrógeno (100 μM , Merck) 1 hora previa al agregado del compuesto $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ²⁶⁶.

Para la detección se utilizó un espectrofluorímetro (Molecular Devices Spectramax Gemini EM) y se realizaron lecturas cada 5 minutos a longitudes de onda

de excitación 492 nm y emisión 520 nm durante 70 minutos manteniendo la placa a 37°C.

El Δ fluorescencia se calculó a tiempo final (70 minutos) utilizando la siguiente fórmula: $\Delta = (\text{promedio de la intensidad de fluorescencia a tiempo final} - \text{promedio de la intensidad de fluorescencia a tiempo 0})$.

Evaluación de los niveles de estradiol en medios condicionados de células T-HESC

Se evaluaron los niveles de estradiol en los medios condicionados de cultivos de células T-HESC tratados por 48 horas con WG (0, 40; 80 μM) mediante la técnica de ELISA utilizando un kit comercial y siguiendo los procedimientos detallados por el fabricante (Estradiol ELISA kit, Cayman Chemical). Los medios condicionados se centrifugaron y se congelaron los sobrenadantes a -20°C hasta su evaluación. Previo al ensayo, se realizó una extracción de hormonas esteroideas, utilizando éter etílico. Brevemente, los medios condicionados se agitaron durante 1 minuto en tubos cónicos de vidrio luego de haber agregado éter etílico en una proporción 1:2 y se incubaron a -70°C durante 1 hora. Luego la fase etérea se traspasó a otro tubo y se dejó evaporar en un baño térmico a 50°C. Se agregó nuevamente éter etílico al tubo inicial y se repitieron los pasos mencionados anteriormente. Una vez finalizada la evaporación del éter los extractos se guardaron a -70°C hasta el día en el que se realizó el ELISA.

La cuantificación de los niveles de estradiol se llevó a cabo según los procedimientos descritos por el proveedor del kit. El ensayo tiene una sensibilidad de 15 pg/ml y un rango de detección de 6,6 a 4000 pg/ml. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro de placas (Labsystems Multiscan) a 405 nm. Los resultados se obtuvieron en pg/ml y se expresaron como porcentaje del basal, media \pm SEM.

Cultivo de la línea celular de mastocitos humanos HMC1.1

Las células HMC1.1 se mantuvieron en medio IMDM (Gibco) suplementado con 10% de suero de caballo (Gibco), estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 UI/ml (Sigma) y tioglicerol 0,01%. Las células se cultivaron en frascos de 175 cm^2 en estufa a 37°C con 5% CO_2 hasta que el número de células fuese suficiente para iniciar el experimento.

Evaluación del ciclo celular por qRT-PCR en células HMC1.1

Se cultivaron las células HMC1.1 por 24 horas antes del inicio del tratamiento en condiciones de hambreado (2% de suero) sin tioglicerol. Luego, 2×10^6 células se sembraron en frascos de 75 cm² y se estimularon con AC: 0; 2,5; 5; 7,5 µg/ml, AR: 0; 25; 50; 100 µg/ml y WG: 0; 20; 40; 80 µM durante 24 horas. A continuación, las células se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml donde fueron centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y a continuación se inició con el proceso de extracción de ARN a partir del sedimento celular.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc de células HMC1.1

Para la extracción de ARN se utilizó el kit "RNeasy Mini kit" (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como se describió previamente ²⁶⁷. Brevemente, se lisaron las células en 350 µl de buffer lisis provisto por el kit con β-mercaptoetanol realizando un riguroso pipeteo. Los lisados celulares se transfirieron a columnas Qias shredder y se centrifugaron a 14000 rpm por 2 minutos. Se agregó etanol 70% a cada lisado celular, el volumen total obtenido se transfirió a mini columnas RNeasy y se centrifugó a 14000 rpm por 30 segundos. Se agregó a cada columna buffer de lavado (RW1), se centrifugó y se descartó el líquido que traspasó la columna. El ARN, retenido en la columna, se incubó por 15 minutos con DNasa (Sigma). A continuación se agregó nuevamente buffer RW1, se centrifugó y se descartó el excedente. Se realizaron otros dos lavados de la columna con un buffer de lavado suave provisto por el kit, seguidos de una centrifugación. Por último, se agregó 30 µl de agua libre de RNasa directamente sobre las columnas y se realizó una última centrifugación para recuperar el ARN total en tubos de microcentrífuga libres de ácidos nucleicos.

La concentración y la pureza del ARN se midió usando un Nanodrop ND 1000 (LabTech International). La transcripción inversa para la síntesis del ADNc se realizó a partir de 100 ng de ARN utilizando la enzima Super Script VILO (Invitrogen) en un volumen final de reacción de 20 µl. Las condiciones durante la síntesis fueron: 25°C durante 10 minutos, seguido de 42°C durante 60 minutos y finalmente 85°C durante 5 minutos.

PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Las qRT-PCR fueron realizadas en un equipo 7900 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) usando la Librería de Sondas Universales de Roche (Universal Probe Library, Roche Applied Science) y el reactivo Supermix Express para PCR

(Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μ l conteniendo 1 μ l de ADNc, 7,5 μ l de Supermix Express 1x, 0,15 μ l de cada cebador (200 nM), 0,15 μ l de la sonda (100 nM) y 6,05 μ l de agua. La amplificación se realizó mediante 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos seguido de 60°C durante 1 minuto. Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran detalladas en la **Tabla 3.3.** Los cebadores dirigidos contra la ciclofilina A humana, utilizada como control endógeno, se obtuvieron de un kit comercial (4310883E, Thermo Fisher Scientific). Los datos fueron analizados con el programa RQ manager (Applied Biosystems) usando el método de $\Delta \Delta Ct$ ²⁶⁸.

Gen	Especie	Cebador (Forward)	Cebador (Reverse)	# sonda
cdc25a	humano	cctccgagtcaacagattca	gggtc gatgagctgaaagat	61
cdk1	humano	cttcgcatc caaatatagtcagtct	accttaacaagtgaagaatccatgt	79
ciclina A2	humano	ccatacctcaagtatattgccatc	tccagtccttcgtattaatgattcag	67
ciclina B1	humano	catgggtgcactttcctcctt	aggtaatggttagagttggtgtcc	18
p21	humano	tcactgtctgtacccttgtgc	ggcgtttgagtgtagaaat	32

Tabla 3.3.: Cebadores y sodas utilizados en las qRT-PCR

Experimentos *in vivo*

Cirugía para la inducción de la endometriosis

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 2 meses de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas, con un ciclo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, en condiciones de temperatura y limpieza adecuadas teniendo acceso a agua y alimento *ad libitum* en el bioterio del IBYME.

A todos los animales se les indujeron lesiones endometriósicas mediante el trasplante de uno de los cuernos uterinos al mesenterio del intestino como se ha descrito previamente²⁶⁹. Brevemente, los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal (i.p.) con 110 mg/kg de ketamina (Holliday) y 10 mg/kg de xilacina (Richmond) y se les realizó una incisión medioventral para exponer el útero y los intestinos. Un cuerno uterino fue removido (sin quitar el ovario) y colocado en medio estéril DMEM-F12. Se lo abrió longitudinalmente y se lo cortó en fragmentos de aproximadamente 4 mm². A continuación, tres fragmentos de cuerno uterino se suturaron con un único punto de sutura con hilo de nylon 6-0 (Supralon, Ethicon) al

mesenterio del intestino, de modo tal que el tejido endometrial quede en contacto con la capa serosa del mesenterio. Previo a suturar el abdomen, se colocó una gota de solución fisiológica suplementada con antibiótico para hidratar la zona peritoneal y favorecer la mejor recuperación del ratón. Este modelo animal ha sido aceptado como modelo experimental para el estudio de la endometriosis en numerosos trabajos publicados ^{191,269–271}.

Diseño Experimental

Todos los tratamientos comenzaron en el día 14 post-cirugía, tiempo en el que se considera que las lesiones endometriósicas están establecidas ^{272,273}. El AC y el AR fueron administrados por vía i.p. durante 14 días consecutivos; WG fue administrada oralmente (v.o.), utilizando una sonda esofágica, durante 12 días consecutivos. El diseño experimental se esquematiza en la **Figura 3.1.**

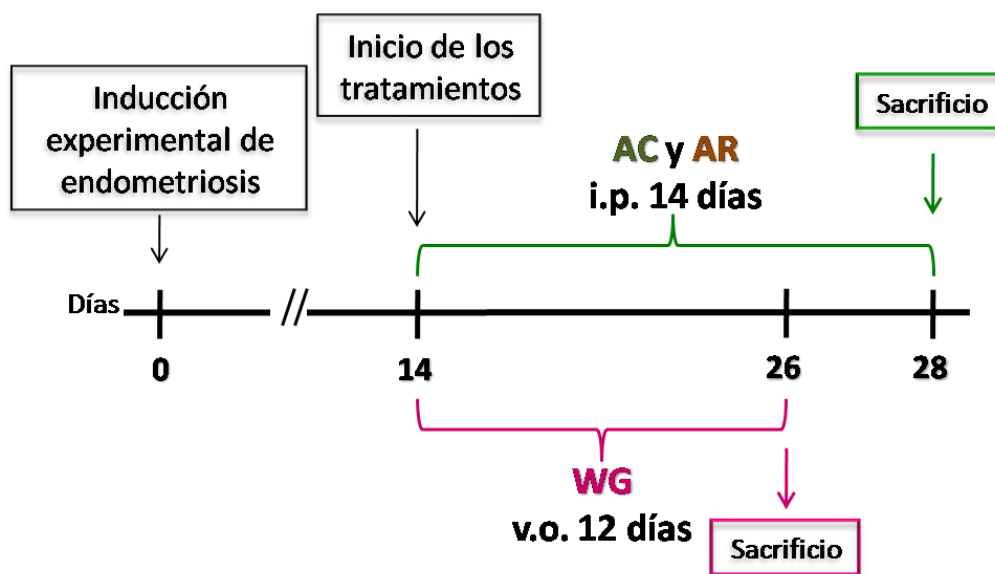


Figura 3.1.: Diseño experimental llevado a cabo en el modelo de endometriosis desarrollado en ratón.

Grupos de ratones controles fueron incluidos en todos los esquemas de tratamiento de acuerdo a lo que se detalla en el texto. AC: ácido carnósico; AR: ácido rosmarínico; WG: wogonina; i.p.: intraperitoneal; v.o.: vía oral.

La elección de las vías de administración se basó a lo reportado en la literatura al momento de la realización del experimento. Debido a la escasa bibliografía disponible sobre la biodisponibilidad del AC y AR luego de la administración oral, se

decidió administrarlos en este primer ensayo i.p. para observar un efecto local y directo en la cavidad peritoneal. WG fue administrada v.o., en suspensión, debido a su baja solubilidad en medios acuosos.

El AC (Enzo Life Sciences, USA) fue disuelto en DMSO y diluido en solución fisiológica (siendo la concentración final de DMSO igual a 0,8%). El AR (Enzo Life Sciences) fue disuelto en PBS. Ambos tratamientos compartieron el grupo control el cual recibió sólo vehículo por la misma vía de administración (0,8 % de DMSO en solución fisiológica). WG (Enzo Life Sciences) fue parcialmente resuspendida en DMSO y diluida en solución fisiológica para su administración v.o. (la concentración final de DMSO resultó en 1,6 %). Su grupo control recibió sólo vehículo respetando la misma vía de administración (1,6 % de DMSO en solución fisiológica). Los grupos de tratamiento, las dosis y vías de administración se detallan en la **Tabla 3.4.**

Grupos	Dosis	Duración	Vía de administración
Control	Vehículo (n=8)	14 días	Intraperitoneal
	Vehículo (n=11)	12 días	Oral (sonda esofágica)
Ácido carnósico	2 mg/kg/día (n=11)	14 días	Intraperitoneal
	20 mg/kg/día (n=10)		
Ácido rosmarínico	1 mg/kg/día (n=11)	14 días	Intraperitoneal
	3 mg/kg/día (n=10)		
Wogonina	20 mg/kg/día (n=12)	12 días	Oral (sonda esofágica)

Tabla 3.4.: Grupos de tratamiento, dosis y vías de administración.

Todos los animales fueron monitoreados diariamente a lo largo del tratamiento. No se encontraron evidencias de toxicidad a las dosis administradas basándonos en el peso corporal, el consumo de alimento, el comportamiento y los niveles de actividad de los animales tratados comparados con los controles. El ciclo estral fue evaluado citológicamente durante los tratamientos sin detectar diferencias en su progresión entre los grupos tratados y controles ²⁷⁴.

Evaluación de las lesiones endometriósicas

Finalizado el tratamiento, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal, se contó el número de lesiones desarrolladas, se midieron los diámetros mayor y menor de cada lesión con un calibre milimetrado y a partir de ellos se calcularon los radios mayor (R) y menor (r). El tamaño de la lesión se calculó utilizando la siguiente fórmula $V=(4/3)\pi.r^2.R$ ²⁷⁵.

Las lesiones fueron extraídas y fijadas durante 24 horas a 4°C en formaldehído al 4% en PBS. Luego se deshidrató el tejido en un gradiente de concentraciones crecientes de alcoholes, se incluyó en tacos de parafina y se cortó en secciones seriadas de 5 µm de grosor. Dos secciones no contiguas de cada muestra fueron coloreadas con hematoxilina-eosina y se examinaron microscópicamente para identificar las características histológicas típicas de las lesiones endometriósicas.

Evaluación de la proliferación celular en las lesiones endometriósicas

La proliferación celular se evaluó por inmunohistoquímica en cortes de lesiones endometriósicas inducidas experimentalmente como se indicó en el apartado anterior empleando un anticuerpo policlonal anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) de ratón obtenido en conejo (Santa Cruz Biotechnology) ²⁶⁹. El antígeno PCNA es una proteína nuclear de 36 kDa que está asociado con la ADN polimerasa delta, enzima responsable de iniciar la duplicación del ADN. El anti-PCNA reconoce células que se encuentran en las diferentes fases de división del ciclo celular, sin asociarse a las células quiescentes ²⁷⁶.

Brevemente, todas las secciones se desparafinaron en xileno y se hidrataron gradualmente a través de soluciones de alcoholes en concentraciones decrecientes y finalmente en agua. Se inactivó la actividad de la peroxidasa endógena durante 30 minutos con una solución de H₂O₂ al 3%. La recuperación de antígeno se llevó a cabo con citrato de sodio 10 mM (pH 6) en un horno de microondas a 600 Watts de potencia. A continuación, todos los cortes se bloquearon durante 1 hora a TA con BSA al 2% en PBS, y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-PCNA (1:800 diluido en PBS con 1% de BSA). Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora a TA con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich) diluido 1:200 en PBS seguido de otra incubación durante 30 minutos a TA con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako) y se reveló la señal con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako) como sustrato de la peroxidasa. Por último, las secciones se colorearon con hematoxilina de Gill, se deshidrataron

gradualmente a través de soluciones de alcoholes en concentraciones crecientes, se aclararon en xileno y se montaron los cubreobjetos con Bálsamo de Canadá.

Como control negativo, no se incluyó el respectivo anticuerpo primario en una sección de cada muestra. Los porta-objetos fueron evaluados al microscopio óptico a 400X de magnificación.

Las células positivas para PCNA (PCNA+) se identificaron con un microscopio óptico de campo claro por la presencia de un precipitado nuclear marrón. La cuantificación de la proliferación celular se realizó contando un mínimo de 400 células (epiteliales y estromales) de al menos cuatro campos representativos de cada corte y se calculó el porcentaje de células PCNA+ sobre el total. Luego los porcentajes se utilizaron para obtener la media de cada grupo experimental.

Evaluación de la apoptosis en las lesiones endometriósicas

Para la cuantificación de la apoptosis, los cortes de las lesiones se sometieron a la técnica TUNEL. Se utilizó el kit de detección de apoptosis In Situ Cell Death POD (Roche). Los cortes se trataron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como se describió anteriormente²⁶². Brevemente, las secciones se desparafinaron con xileno, se rehidrataron con etanol en concentraciones decrecientes y se permeabilizaron con 20 µg/ml de Proteinasa K (Gibco). La peroxidasa endógena se inactivó con H₂O₂ al 3%, luego se incubó 1 hora a 37°C con la enzima TdT y los nucleótidos marcados con fluoresceína. A continuación se incubó con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidasa (POD), seguido del sustrato de la peroxidasa, DAB. La tinción de contraste se realizó con hematoxilina. Los controles negativos se obtuvieron sometiendo cortes de tejido a un tratamiento idéntico al de las muestras a evaluar pero sin el agregado de la enzima TdT.

Los porta-objetos fueron evaluados al microscopio óptico a 400X de magnificación, se contaron un mínimo de 400 células (estromales y epiteliales) de al menos cuatro campos representativos de cada corte y se cuantificó el porcentaje de células TUNEL positivas (TUNEL+) sobre el total. Luego los porcentajes se utilizaron para obtener la media de cada grupo experimental.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático Prism 5.0 (GraphPad). En todos los casos en que se contaba con 3 o más grupos experimentales y los datos cumplieron con los supuestos de independencia,

normalidad y homocedasticidad, las comparaciones estadísticas se realizaron aplicando el análisis de la varianza de un solo factor seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En los casos en el que el n experimental fue menor a 5 y no pudo corroborarse la homogeneidad de las varianzas, se procedió a realizar el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. En el caso en que solamente se contaba con dos grupos experimentales, la comparación estadística se realizó aplicando la prueba de t-Student no pareada. En todos los análisis realizados se consideró que existía significancia estadística cuando $p < 0,05$.

4. Resultados

Efectos del ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre la regulación del crecimiento de células estromales endometriales humanas utilizadas como modelo experimental de endometriosis

Evaluación de la proliferación de células estromales endometriales

Comenzamos nuestro estudio evaluando el efecto de diferentes concentraciones de los compuestos sobre la proliferación de células estromales endometriales aisladas y cultivadas a partir de biopsias de endometrio de mujeres controles y de pacientes con endometriosis (cultivos primarios). Se calculó el porcentaje de proliferación celular respecto al basal (incubado sólo con vehículo) luego de estímulos de 24 horas.

Los resultados obtenidos muestran que la dosis de 10 µg/ml de AC indujo una disminución significativa de la proliferación de células estromales endometriales provenientes tanto de mujeres del grupo control como de pacientes con endometriosis ($p < 0,001$ y $p < 0,05$ respectivamente vs. basal, **Fig. 4.1.Ai y Aii**).

Las concentraciones de 50 y 100 µg/ml de AR redujeron significativamente el porcentaje de proliferación de células estromales endometriales provenientes de mujeres del grupo control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente vs. basal, **Fig. 4.1.Bi**), siendo la dosis más alta también efectiva en los cultivos primarios provenientes de pacientes con endometriosis ($p < 0,05$ vs. basal, **Fig. 4.1.Bii**).

Los efectos de WG fueron similares en ambos grupos de cultivos primarios. La dosis de 80 µM inhibió la proliferación de células provenientes de biopsias endometriales de mujeres del grupo control ($p < 0,001$ vs. basal, **Fig. 4.1.Ci**), mientras que las dosis de 40 y 80 µM fueron efectivas en reducir la proliferación en cultivos de células de pacientes con endometriosis ($p < 0,05$ vs basal, **Fig. 4.1.Cii**).

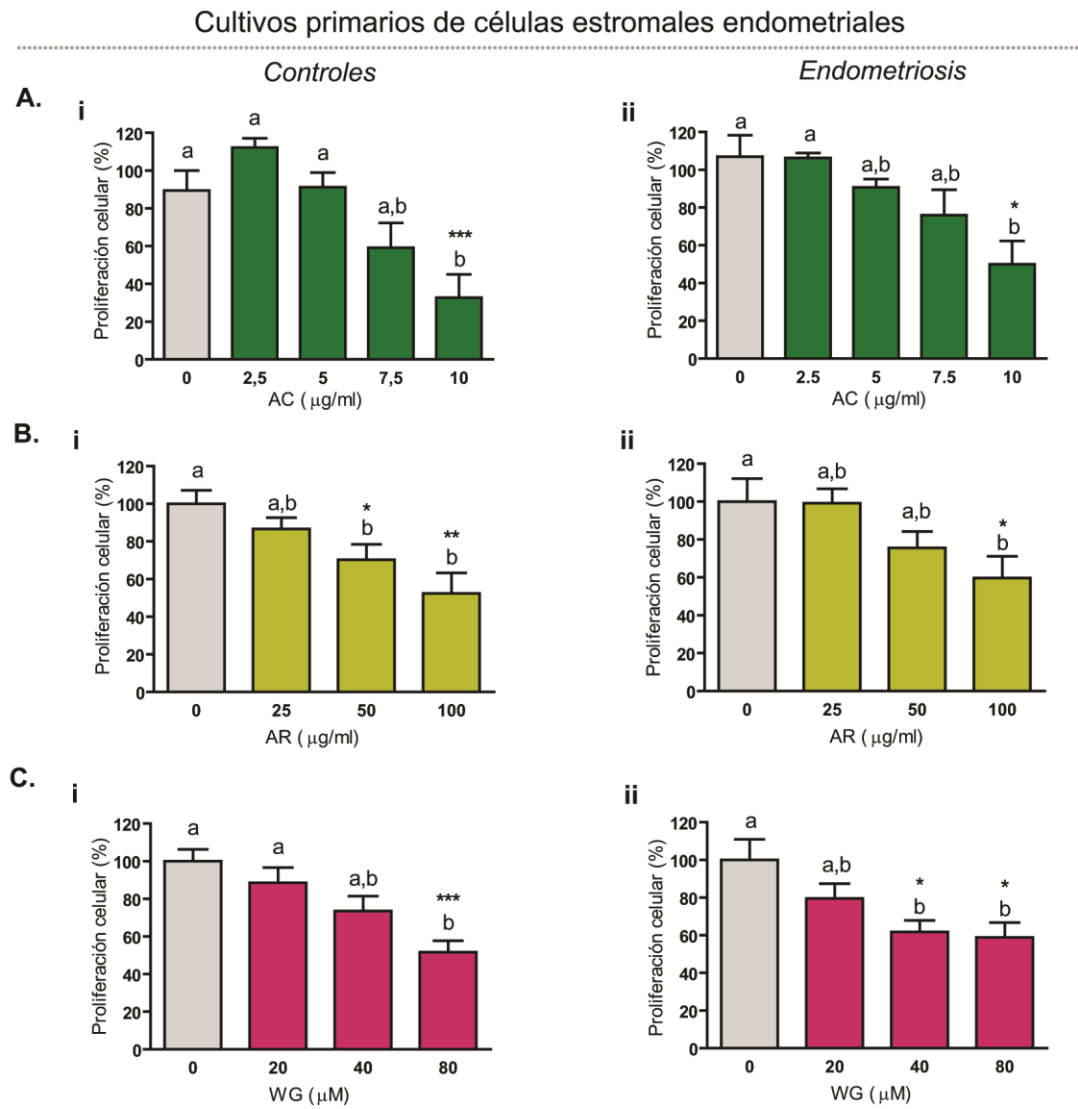


Figura 4.1.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la proliferación de células estromales endometriales.

Se evaluó proliferación por la técnica de reducción del MTS en cultivos primarios de **(i)** células estromales endometriales provenientes de mujeres controles ($n=6-9$) y en **(ii)** células estromales endometriales provenientes de pacientes con endometriosis ($n=7$) estimuladas durante 24 horas con **(A)** AC, **(B)** AR y **(C)** WG. Los resultados se expresan como porcentaje del basal, media \pm SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. basal. Las letras a, b y c indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre dosis dentro de los grupos.

Una vez evidenciado el efecto antiproliferativo de los compuestos sobre los cultivos primarios, nos interesó evaluar su acción sobre la proliferación de la línea celular estromal endometrial humana T-HESC. En este caso también se calculó el porcentaje de proliferación celular respecto al basal luego de 24 horas de estímulo.

Como se observa en la **Figura 4.2.A**, las dosis de 10, 12,5 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de AC provocaron una disminución significativa del porcentaje de proliferación celular ($p < 0,05$, $P < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente vs. basal, **Fig. 4.2.A**). Las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de AR resultaron ser aquellas capaces de inhibir la proliferación estromal endometrial ($p < 0,05$ y $p < 0,001$ vs. basal, **Fig. 4.2.B**), mientras que para el caso de WG las concentraciones efectivas fueron las de 40, 80 y 160 μM ($p < 0,05$, $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente, vs. Basal, **Fig. 4.2.C**).

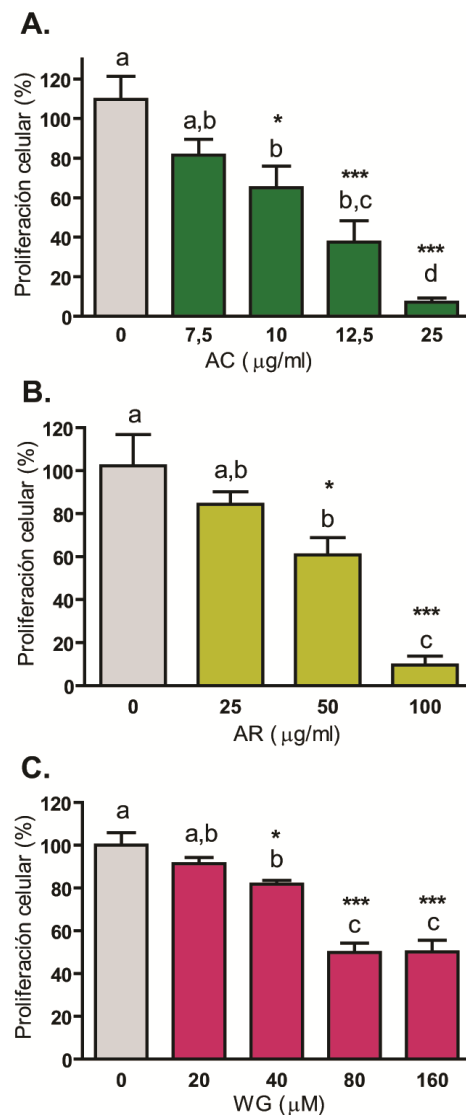


Figura 4.2.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la proliferación de la línea celular estromal T-HESC.

Se evaluó la proliferación celular por la técnica de reducción del MTS en células estimuladas durante 24 horas con **(A)** AC **(B)** AR y **(C)** WG. Los resultados se expresan como porcentaje del basal, media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. basal. Las letras a, b y c indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre dosis dentro de los grupos, ($n=7$).

El ácido carnósico, el ácido rosmarínico y la wogonina mostraron claros efectos antiproliferativos sobre los distintos cultivos de células estromales endometriales humanas.

Dada la evidencia de que tanto la línea celular como los cultivos primarios se comportaron de manera similar en los ensayos evaluados y frente a la complejidad que confiere el manejo y establecimiento de cultivos primarios, la investigación continuó utilizando las células T-HESC como modelo experimental *in vitro* representativo.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si los efectos observados sobre la proliferación celular estaban asociados a posibles efectos sobre la regulación del ciclo celular y/o inducción de apoptosis en las células T-HESC.

Evaluación del ciclo celular en células T-HESC

Las fases del ciclo celular fueron analizadas por citometría de flujo, luego de haber estimulado los cultivos durante 48 horas con los compuestos, fijado las células y teñido el ADN con yoduro de propidio.

En la **Figura 4.3.Ai, Bi y Ci** se muestran los histogramas obtenidos para la condición basal y para la máxima dosis de cada compuesto (5 µg/ml de AC, 100 µg/ml de AR y 80 µM de WG). En los histogramas se observa la delimitación de las fases y la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M). También se determinó el porcentaje de células con contenido de ADN sub-diploide (sub-G1). La cuantificación del porcentaje de células evaluado en cada estadio se observa en la **Figura 4.3.Aii, Bii y Cii**.

Como se puede observar en la **Figura 4.3.Aii**, el porcentaje de células en la fase G0/G1 decreció significativamente después del tratamiento con 2,5 y 5 µg/ml de AC ($p < 0,01$ y $0,001$ vs. basal, respectivamente). Asimismo la dosis de 5 µg/ml de AC incrementó la fase S ($p < 0,05$ vs. basal), y ambas dosis incrementaron el porcentaje de células en el estadio G2/M ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ vs. basal respectivamente).

Es importante destacar que el rango de concentraciones de AC utilizado para la evaluación del ciclo celular en las T-HESC fue inferior al utilizado para los ensayos de proliferación celular. Se realizó esta modificación porque la puesta a punto del ensayo de evaluación del ciclo celular por citometría de flujo nos condujo a establecer el

tiempo de estímulo en 48 horas. Al aumentar el tiempo de estímulo observamos que las dosis más altas provocaban que las células se despegaran de las placas de cultivo dificultando el análisis. Por este motivo, hemos analizado el efecto de AC sobre el ciclo celular solamente luego de la incubación con las dosis de 2,5 y 5 µg/ml.

Cuando evaluamos el efecto del AR observamos que el tratamiento con 50 y 100 µg/ml no alteró la distribución del ciclo celular (**Fig. 4.3.Bii**).

De manera similar a lo observado luego del estímulo con AC, el estímulo con WG provocó una disminución significativa de la fase G0/G1 con las concentraciones de 40 y 80 µM ($p < 0,001$ vs. basal). Complementariamente, la fase S se vio incrementada después del estímulo con 40 µM de WG ($p < 0,05$ vs. basal) así como también la fase G2/M, después del tratamiento con 40 y 80 µM ($p < 0,001$ vs. basal, **Fig. 4.3.Cii**).

Por último, cabe destacar que todos los compuestos incrementaron entre un 4 y 10% el porcentaje de células en sub-G1 ($p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,01$ para AC, AR y WG respectivamente vs. basal, **Fig. 4.3.**) sugiriendo un posible efecto proapoptótico de los compuestos sobre las células endometriales. Este índice es un indicativo de pequeños fragmentos de ADN generados como consecuencia de la muerte celular programada. El contenido en ADN, tras la permeabilización con detergentes o precipitación con alcoholes, disminuye y como consecuencia, es detectado como células con baja tinción para el ADN en estadio sub-G1²⁷⁷.

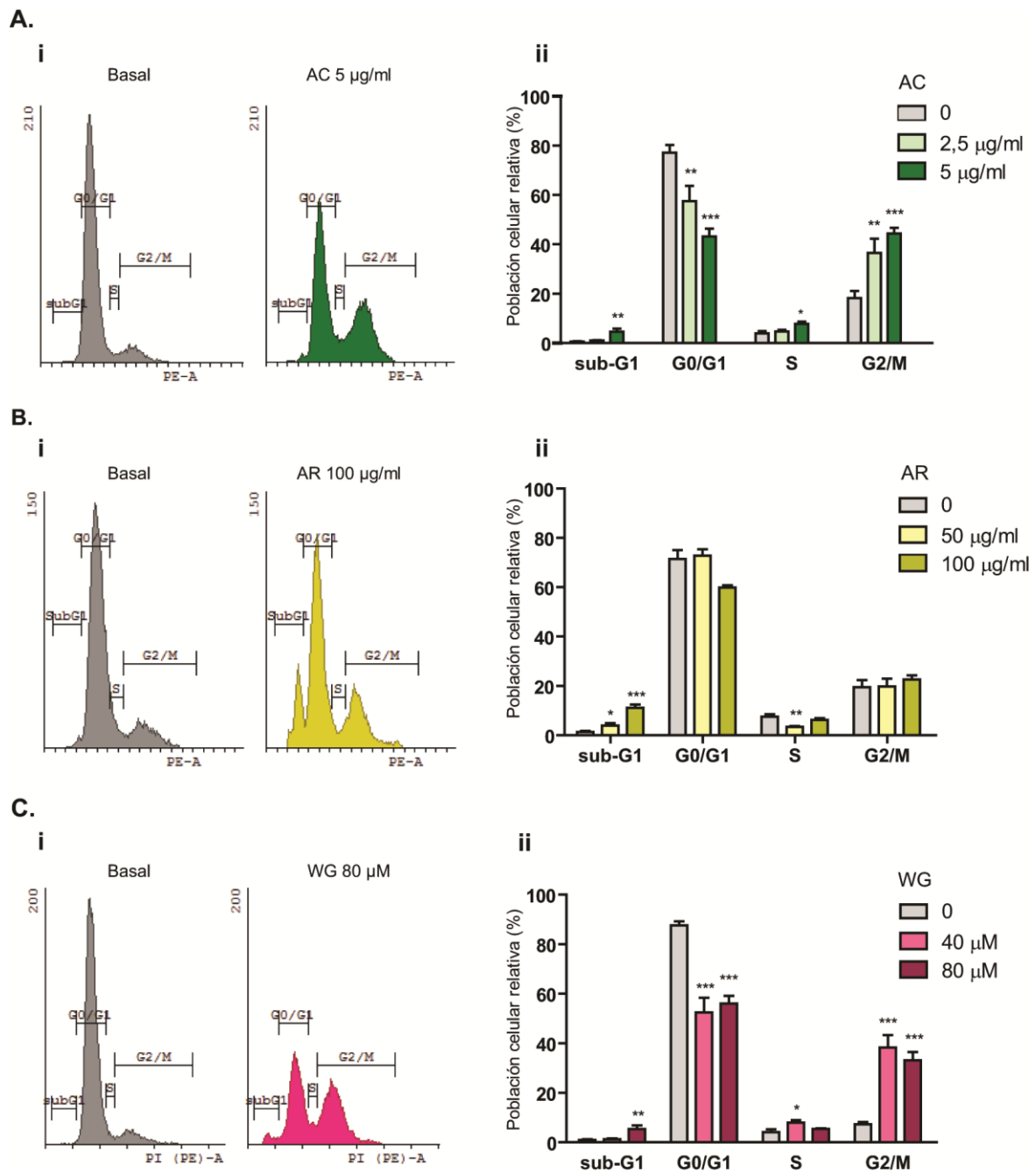


Figura 4.3.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la progresión del ciclo celular de T-HESC.

Luego de la marcación del ADN con yoduro de propidio, se evaluó el ciclo celular por citometría de flujo en células estimuladas durante 48 horas con (A) AC, (B) AR y (C) WG. (i) Histogramas representativos a un ensayo obtenidos para la condición basal y para la máxima dosis de cada tratamiento. Se muestra la delimitación de las fases del ciclo. (ii) Porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular luego del tratamiento con AC (n=7), AR (n=7) y WG (n=6). Los resultados se expresan como porcentaje del basal, media \pm SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. basal.

Observando los efectos del AC y WG sobre el ciclo celular, nos propusimos evaluar a continuación la expresión de Ciclina B1, CDK1 y p21, tres de las proteínas que participan en la regulación de la transición de G2 a mitosis, etapa en la cual se observó arresto celular luego de los tratamientos.

En la **Figura 4.4.** se muestran los resultados obtenidos luego de 48 horas de estímulo de T-HESC con AC. Si bien se observó una leve disminución de la expresión de Ciclina B1 y CDK1, las diferencias no alcanzaron valores estadísticamente significativos ($p=0,08$ y $p=0,07$ para Ciclina B1 y CDK1 respectivamente, **Fig. 4.4.A-B**). La expresión de p21 no se vio alterada por el tratamiento (**Fig. 4.4.C**).

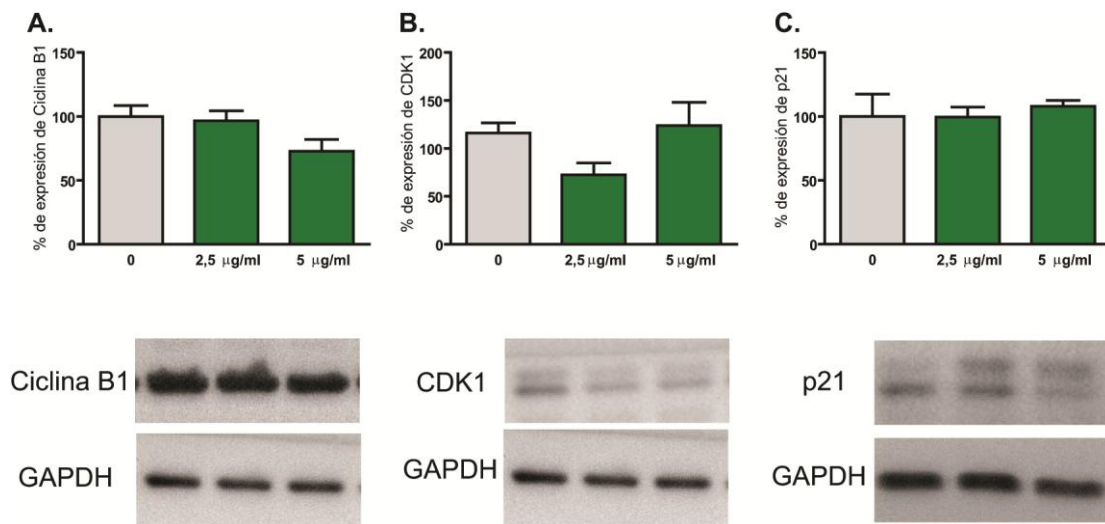


Figura 4.4.: Efecto del ácido carnósico (AC) sobre la expresión de Ciclina B1, CDK1 y p21.

Las células T-HESC fueron estimuladas durante 48 horas con AC 0; 2,5; 5 µg/ml. Se evaluó la expresión de **(A)** Ciclina B1 ($p=0,08$, $n=6$), **(B)** CDK1 ($p=0,07$, $n=5$) y **(C)** p21 ($p=0,8$, $n=8$) por la técnica de Western blot. En los paneles inferiores se muestran fotografías representativas de la expresión de cada una de las proteínas evaluadas con su correspondiente control de carga (GADPH). Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

De manera similar, luego del tratamiento con WG, no observamos alteración de la expresión de estas proteínas (**Fig. 4.5.**).

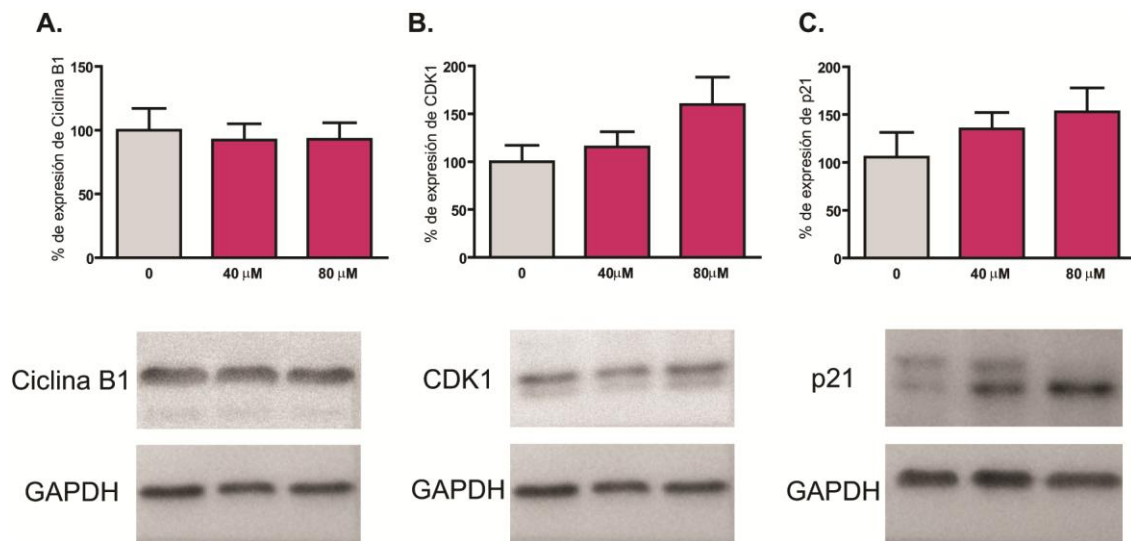


Figura 4.5.: Efecto de wogonina (WG) sobre la expresión de Ciclina B1, CDK1 y p21.

Las células T-HESC fueron estimuladas durante 48 horas con WG 0; 40; 80 μ M. Se evaluó la expresión de (A) Ciclina B1 ($p=0,9$, $n=8$), (B) CDK1 ($p=0,15$, $n=8$) y (C) p21 ($p=0,36$, $n=8$) por la técnica de Western blot. En los paneles inferiores se muestran fotografías representativas de la expresión de cada una de las proteínas evaluadas con su correspondiente control de carga (GAPDH). Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

El ácido carnósico y la wogonina inducen arresto de las células T-HESC en el estadio G2/M. Las proteínas Ciclina B1, CDK1 y p21 no estarían involucradas en la modulación de estos cambios.

Evaluación de la apoptosis en células T-HESC

Si bien el aumento del porcentaje de células en sub-G1 observado luego del tratamiento con los compuestos sugería la presencia de células apoptóticas, este resultado necesitaba ser validado por otra técnica específica para detectar apoptosis.

Para ello estimulamos células T-HESC durante 24 y 48 horas con AC, AR y WG utilizando las dosis que habían sido efectivas para inhibir la proliferación y/o inducir arresto celular, y a continuación se realizó la técnica de TUNEL analizando los eventos por citometría de flujo.

Es importante destacar que la compensación del citómetro resultó ser dificultosa, así como también el análisis de los resultados debido a la fluorescencia propia de los

compuestos emitida sobre el canal FITC (**Fig. 4.6.**). Como se observa en la **Figura 4.7.** no se detectaron células TUNEL positivas luego de los tratamientos.

Sugerimos que este problema técnico podría estar encubriendo y por eso imposibilitando la detección del pequeño porcentaje (4-10%) de células apoptóticas observado en la fase sub-G1.

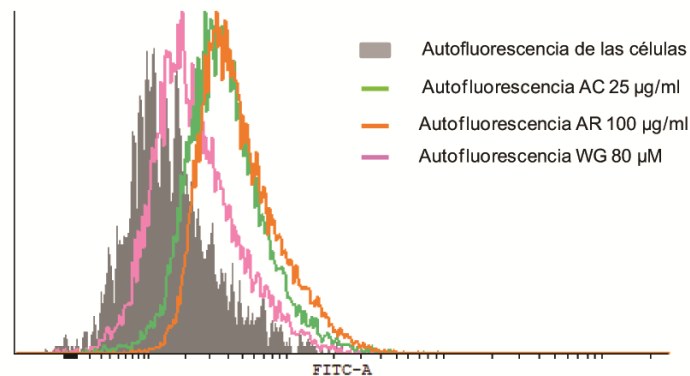


Figura 4.6.: Autofluorescencia del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG).

Células T-HESC fueron tratadas por 24 horas con 25 µg/ml de AC, 100 µg/ml de AR y 80 µM de WG. Luego las células se levantaron, se fijaron en PFA 1% y se pasaron por el citómetro sin ningún tipo de marcación. La fluorescencia emitida en el canal FITC fue detectada y corresponde a la autofluorescencia de las células con o sin tratamiento.

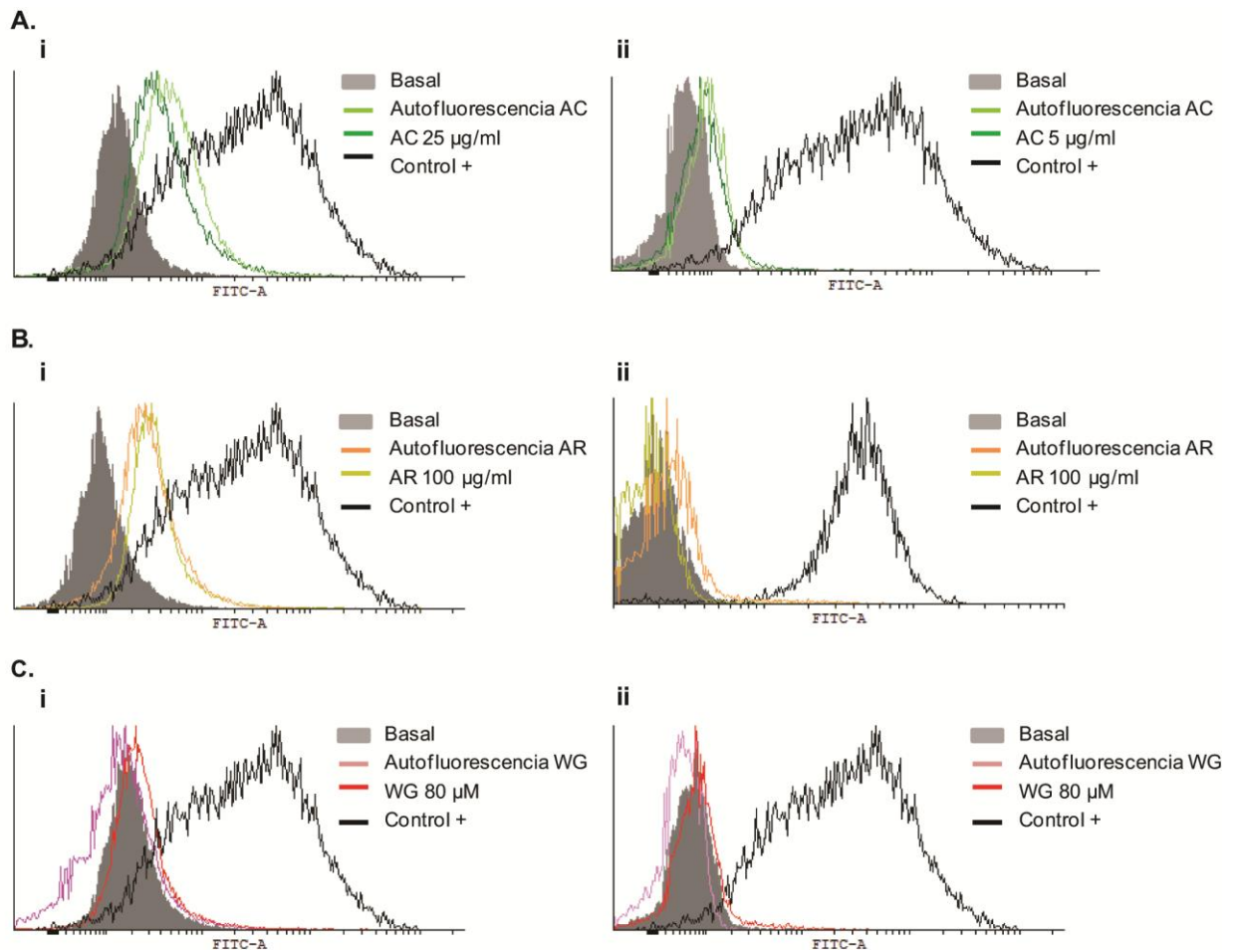


Figura 4.7.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la apoptosis de las células T-HESC.

Las células T-HESC fueron estimuladas durante (i) 24 horas y (ii) 48 horas con (A) AC 25 y 5 µg/ml, (B) AR 100 µg/ml y (C) WG 80 µM. Al cabo de este tiempo las células se levantaron, se fijaron en PFA1% y se realizó la técnica de TUNEL. No se observó un incremento de los niveles de fluorescencia respecto a los controles de autofluorescencia correspondientes para cada compuesto. Cada experimento se repitió entre 2 y 4 veces. El control positivo consistió en células Jurkat estimuladas con 1 µM de estaurosporina durante 24 horas.

No se detectaron células T-HESC apoptóticas mediante la técnica de TUNEL luego del tratamiento con ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina

Evaluación de la generación de especies reactivas del oxígeno en T-HESC

La generación intracelular de especies reactivas del oxígeno (ERO) se midió luego de 24 horas de estímulo con diferentes concentraciones de cada compuesto por espectrofluorimetría utilizando la molécula 2'7' H₂DCF-DA. Los resultados se exponen en la **Figura 4.8.** En los gráficos de la izquierda (i), se muestran los niveles de fluorescencia (expresados en unidades arbitrarias) para cada condición en función del tiempo mientras que a la derecha (ii) se exponen los resultados obtenidos luego de la cuantificación.

Como se observa en la **Figura 4.8.Ai**, si bien hubo una leve disminución de la producción de ERO después del tratamiento con AC, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Fig. 4.8.Aii**).

Luego del tratamiento con 50 y 100 µg/ml de AR, las intensidades de fluorescencia detectadas fueron significativamente inferiores respecto a la condición basal ($p < 0,001$, **Fig. 4.8.Bii**), lo que indica que este compuesto ejerció un efecto antioxidante al capturar las ERO intracelulares evitando que éstas oxiden a la molécula H₂DCF.

Por el contrario después del tratamiento con 80 µM de WG se vio un incremento de la producción de ERO respecto al basal ($p < 0,05$, **Fig. 4.8.Cii**). Al realizar un pre-tratamiento con un compuesto con probados efectos antioxidantes como es la N-acetil cisteína (NAC), este efecto fue contrarrestado. Estos resultados indican que a esa concentración, WG tiene un efecto prooxidante promoviendo la generación de ERO sobre las células T-HESC.

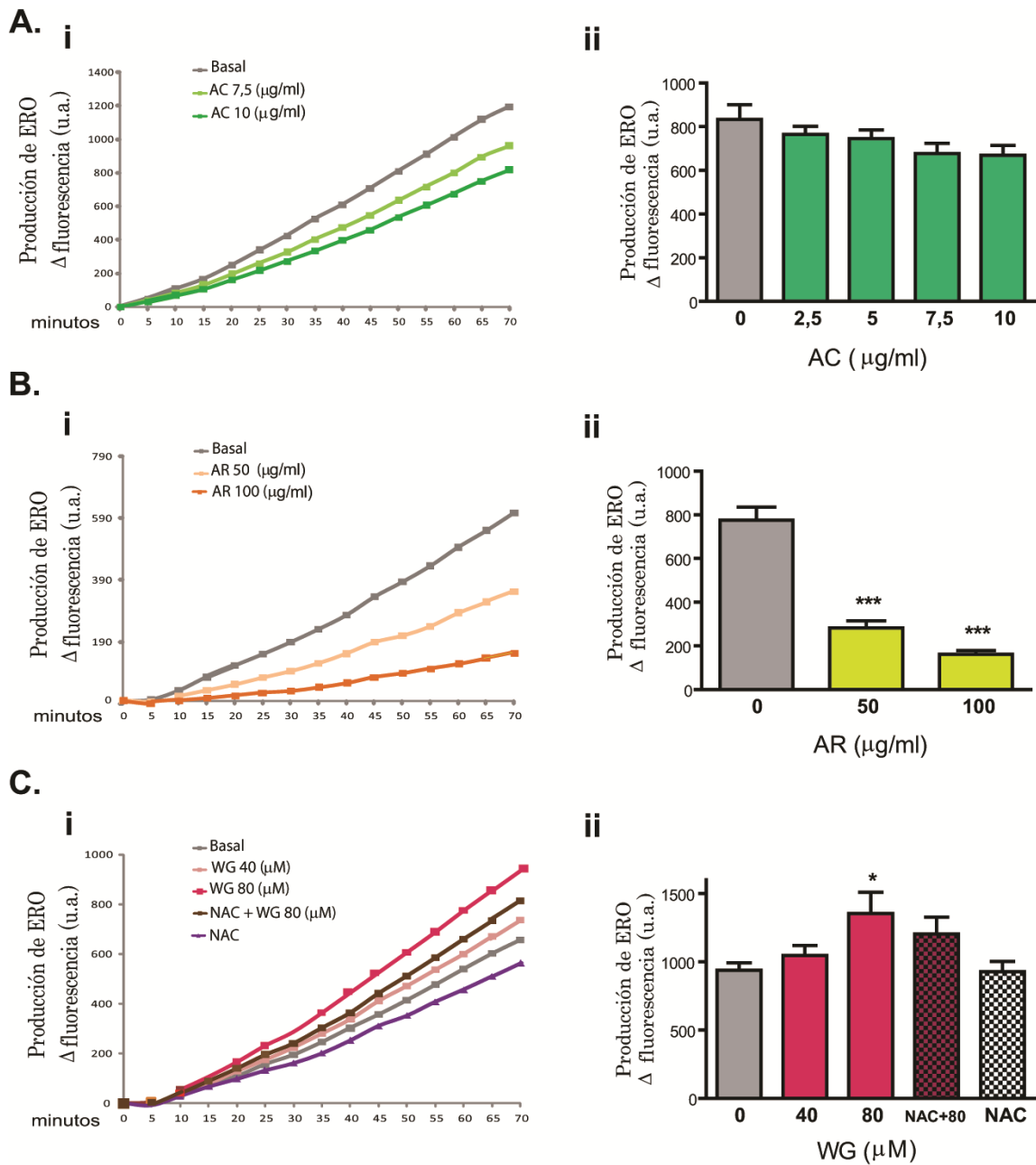


Figura 4.8.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la generación de ERO en T-HESC.

La producción de ERO en células T-HESC estimuladas durante 24 horas con (A) AC (n=7), (B) AR (n=6) y (C) WG (n=9) se evaluó por espectrofluorimetría utilizando la molécula H₂DCF-DA. (i) Gráficos de un ensayo representativo donde se observa el Δ fluorescencia en función del tiempo. (ii) La cuantificación de los resultados se expresa como Δ fluorescencia calculada a tiempo final 70 minutos. *p<0,05 y ***p<0,001 vs. basal.

El ácido rosmarínico ejerció un efecto antioxidante mientras que wogonina un efecto prooxidante sobre las células T-HESC.

Evaluación de la expresión de receptores de estrógenos y secreción de estradiol en T-HESC

Conociendo el rol de los estrógenos en la promoción y mantenimiento de la endometriosis, nos pareció de suma importancia evaluar el efecto de los compuestos sobre la expresión de los receptores de estrógenos. Para ello las células fueron estimuladas durante 48 horas con AC, AR y WG y la expresión proteica del receptor de estrógeno α (ER α) fue evaluada mediante la técnica de Western blot.

Como se observa en la **Figura 4.9.A y B**, luego del tratamiento con AC y AR el nivel de expresión del ER α no se vio modificado manteniéndose similar a la condición basal. Por el contrario, luego del tratamiento con 40 y 80 μ M de WG la expresión del receptor se redujo significativamente comparada al basal sin tratamiento ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente, **Fig. 4.9.C**).

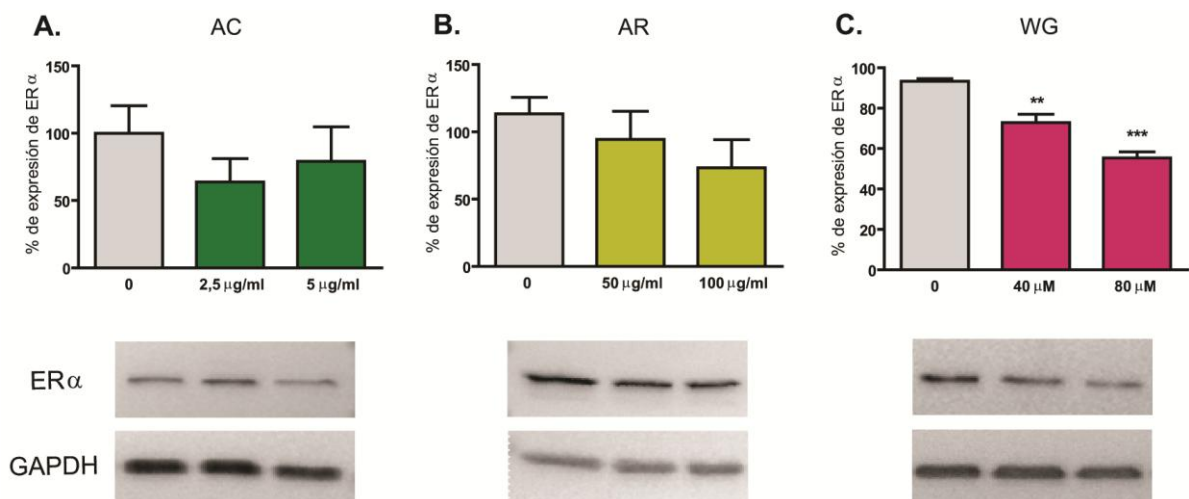


Figura 4.9.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la expresión del receptor de estrógenos α .

Las células T-HESC fueron estimuladas durante 48 horas con (A) AC (n=5), (B) AR (n=6) y (C) WG (n=5). Se evaluó la expresión del receptor de estrógenos α (ER α) por la técnica de Western blot. En los paneles inferiores se muestran fotografías representativas de la expresión y su correspondiente control de carga (GAPDH). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. basal.

Por otro lado, diferentes anticuerpos monoclonales fueron testeados a fin de evaluar la expresión del receptor de estrógenos β (ER β) (**Tabla 3.1.**). Sin embargo,

ninguno de ellos pudo utilizarse ya que no se detectaron bandas específicas a la altura esperada y reportada por los fabricantes (55 y 56 kDa).

Después de haber detectado el efecto inhibitorio de WG sobre la expresión del ER α , nos pareció interesante evaluar mediante un ELISA los niveles de estradiol en los medios condicionados (MC) de las células T-HESC estimuladas por 48 horas con dicho compuesto.

Los resultados se muestran en la **Figura 4.10.** y se expresan como porcentaje respecto al basal. No se observaron diferencias en los niveles de estradiol después del tratamiento con WG, siendo las concentraciones promedio para el grupo control, 40 y 80 μ M de 2,1; 2,4 y 3,7 pg/ml respectivamente.

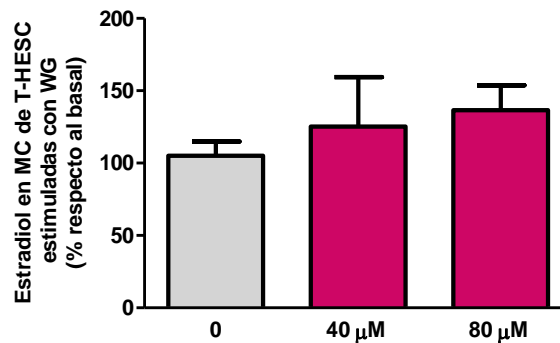


Figura 4.10.: Efecto de wogonina (WG) sobre los niveles de estradiol en medios condicionados de células T-HESC.

Las células T-HESC fueron estimuladas con 40 y 80 μ M de WG durante 48 horas. Los medios condicionados fueron colectados, centrifugados y mantenidos a -20°C hasta el momento de su utilización. Se evaluó el contenido de estradiol por ELISA, previa extracción de hormonas esteroideas utilizando éter etílico. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al basal, media \pm SEM. n=5

Wogonina inhibió la expresión del receptor de estrógeno α en células T-HESC, pero no tuvo efectos sobre la secreción de estradiol por parte de las células.

Efecto del ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre la regulación del ciclo celular de mastocitos humanos

Evaluación del ciclo celular en HMC1.1

Se sabe que los mastocitos cumplen un papel importante en patologías que involucran dolor e inflamación crónica como es la endometriosis. Siendo así, nos interesó evaluar el efecto de estos compuestos sobre la línea celular humana de mastocitos HMC1.1.

Las células recibieron un estímulo de 24 horas con AC, AR y WG y se evaluó la expresión de ciclina A2, ciclina B1, cdk1, cdc25a y p21 por RT-qPCR.

Si bien se observó una notable disminución de la expresión de ciclina A2, ciclina B1, cdk1 y cdc25a después del tratamiento con AC 2,5; 5 y 7,5 µg/ml las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al basal (**Fig. 4.11.Ai-iv**). Por el contrario, la expresión del inhibidor de la formación del complejo ciclina-quinasa dependiente de ciclina, p21, se vio significativamente aumentada luego del tratamiento con 2,5; 5 y 7,5 µg/ml del AC ($p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente vs. basal, **Fig. 4.11.Av**).

No se observó ningún efecto regulatorio sobre la expresión de estos genes luego del tratamiento con AR (**Fig. 4.11.Bi-v**).

Por su parte, WG 40 y 80 µM indujo una significativa disminución de la expresión génica de ciclina A2, ciclina B1, cdk1 y cdc25a respecto al basal ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, **Fig. 4.11.Ci-iv**). Este efecto fue complementario al incremento de la expresión de p21 ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,05$ para 20, 40 y 80 µM respectivamente vs. basal, **Fig. 4.11.Cv**).

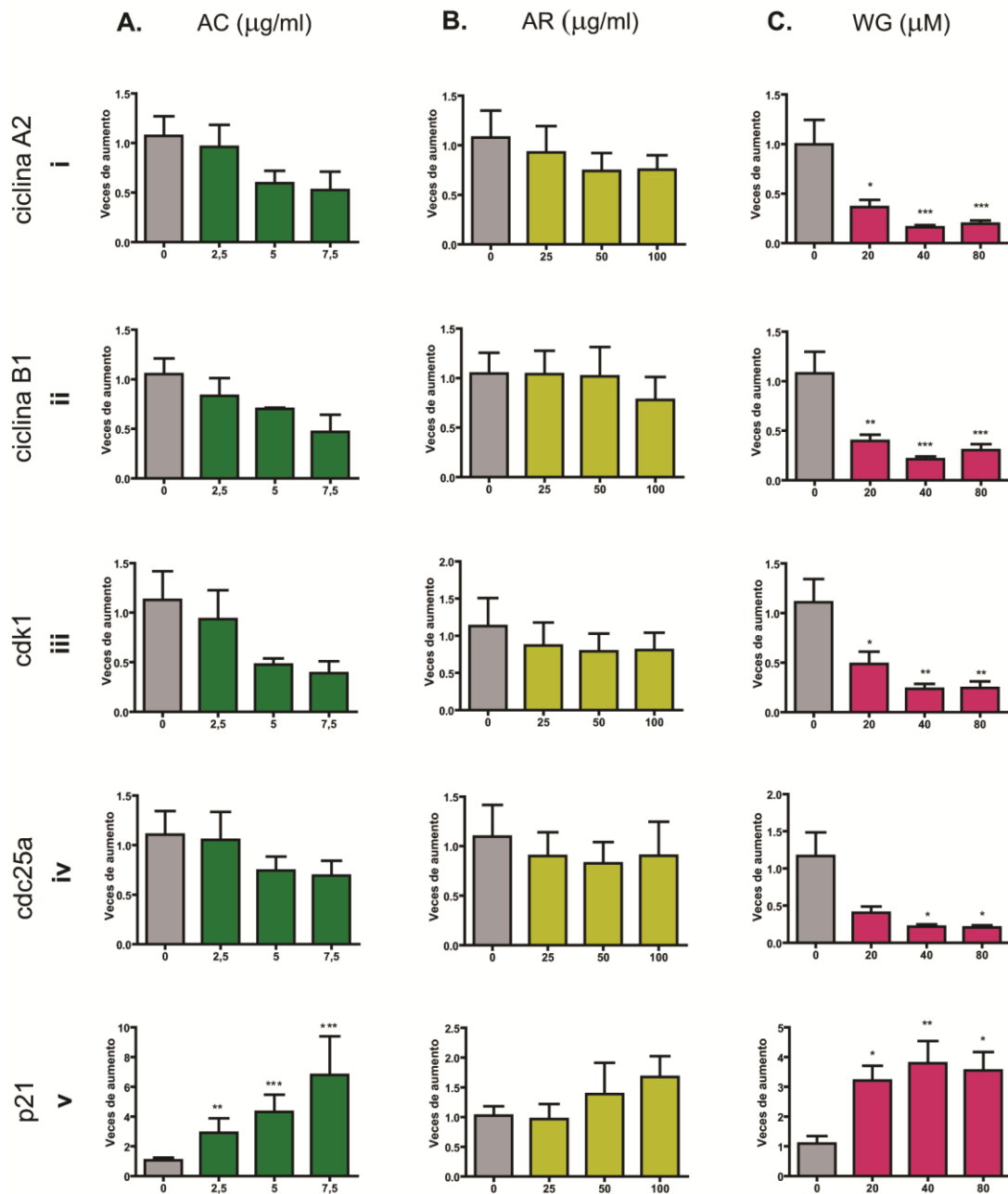


Figura 4.11.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la expresión de genes implicados en el ciclo celular en células HMC1.1.

Se evaluó por RT-qPCR la expresión de (i) ciclina A2, (ii) ciclina B1, (iii) cdk1, (iv) cdc25a y (v) p21 en células HMC1.1 estimuladas durante 24 horas con (A) AC (n=5), (B) AR (n=3) y (C) WG (n=5). *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 vs. basal.

El ácido carnósico y la wogonina indujeron cambios en la expresión génica de proteínas involucradas en el ciclo celular que podrían conducir a un arresto de las células HMC1.1 en el estadio G2/M.

Efectos del tratamiento con ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre el desarrollo de lesiones endometriósicas inducidas en ratón

Efecto del AC, AR y WG sobre el volumen y el número de las lesiones endometriósicas

A partir de los resultados obtenidos *in vitro*, quisimos complementar los estudios y evaluar el efecto de estos tres compuestos naturales sobre el desarrollo de la endometriosis experimental en ratón.

Luego del tratamiento con AC, AR y WG los animales se sacrificaron y se evaluó el grado de desarrollo de la enfermedad. El primer examen que se realizó, fue el análisis macroscópico de la cavidad peritoneal. Se localizaron y contaron las lesiones endometriósicas desarrolladas e, *in situ*, se las midió con un calibre en dos ejes perpendiculares para determinar su tamaño. Los resultados de estas observaciones se muestran en la **Figura 4.12.**

Las dosis más altas de AC y AR evaluadas disminuyeron de manera significativa el volumen de las lesiones desarrolladas por ratón comparado con el grupo control (**Fig. 4.12.Ai**, $p < 0,01$ y **4.12.Bi**, $p < 0,05$ para AC y AR, respectivamente). De manera similar, WG indujo una disminución significativa del tamaño de las lesiones desarrolladas (**Fig. 4.12.Ci**; $p < 0,05$ vs. grupo control). Sin embargo, ninguno de los tratamientos provocó cambios significativos en el número de lesiones establecidas (**Fig. 4.12.Aii**; **Bii** y **Cii**).

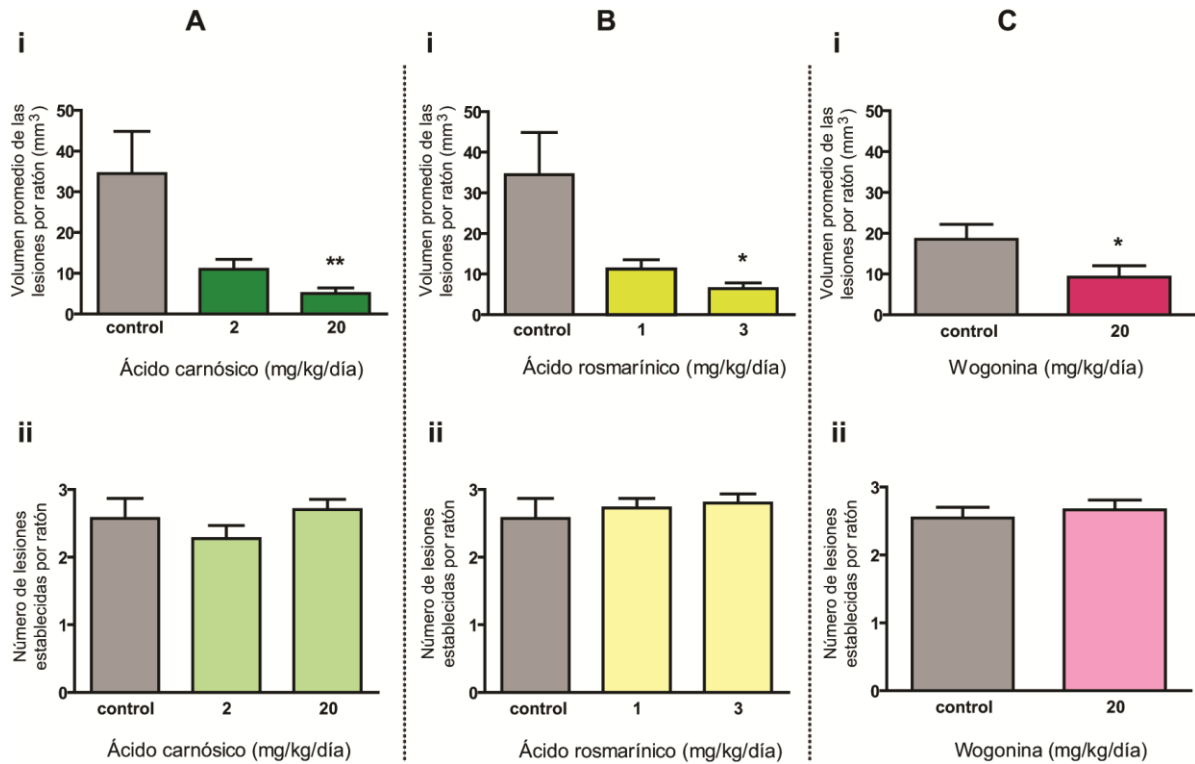


Figura 4.12.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre (i) el volumen y (ii) el número de las lesiones endometriósicas.

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Los animales se sacrificaron y el número de lesiones establecidas se contó y midió luego de: **(A)** 14 días de tratamiento por vía i.p. con vehículo (control; n=8), 2 mg/kg/día (n=11) y 20 mg/kg/día (n=10) de AC; **(B)** 14 días de tratamiento por vía i.p. con vehículo (control; n=8), 1 mg/kg/día (n=11) y 3 mg/kg/día (n=10) de AR; **(C)** 12 días de tratamiento por v.o. con vehículo (control, n=11) y 20 mg/kg/día (n=12) de WG. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. grupo control.

El ácido carnósico, el ácido rosmarínico y la wogonina inhibieron el volumen de las lesiones endometriósicas en ratón.

Una vez que las lesiones se contaron y midieron, se extrajeron y fijaron para poder realizar distintas evaluaciones sobre cortes histológicos de las mismas. Por un lado, se realizó inmunohistoquímica para evaluar la proliferación celular. Se utilizó como marcador el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para cuantificar las

células que presentaban una proliferación celular activa. Por otro lado, se estudió y cuantificó el número de células en apoptosis en las lesiones endometriósicas por la técnica de TUNEL. En ambos casos se contaron células estromales y epiteliales positivas para cada una de las marcaciones y se calculó el porcentaje de células positivas, PCNA+ o TUNEL+, respecto al total de células contadas.

Evaluación de proliferación celular en las lesiones endometriósicas

Como puede verse en la **Figura 4.13.Ai-Ci**, todos los tratamientos disminuyeron de manera significativa la proliferación celular en las lesiones endometriósicas en comparación con el grupo control (AC y WG: $p < 0,05$; AR: $p < 0,001$). A la derecha de la **Figura 4.13.** se observan micrografías representativas de la inmunomarcación de PCNA (**Fig. 4.13.Aii-Cii**).

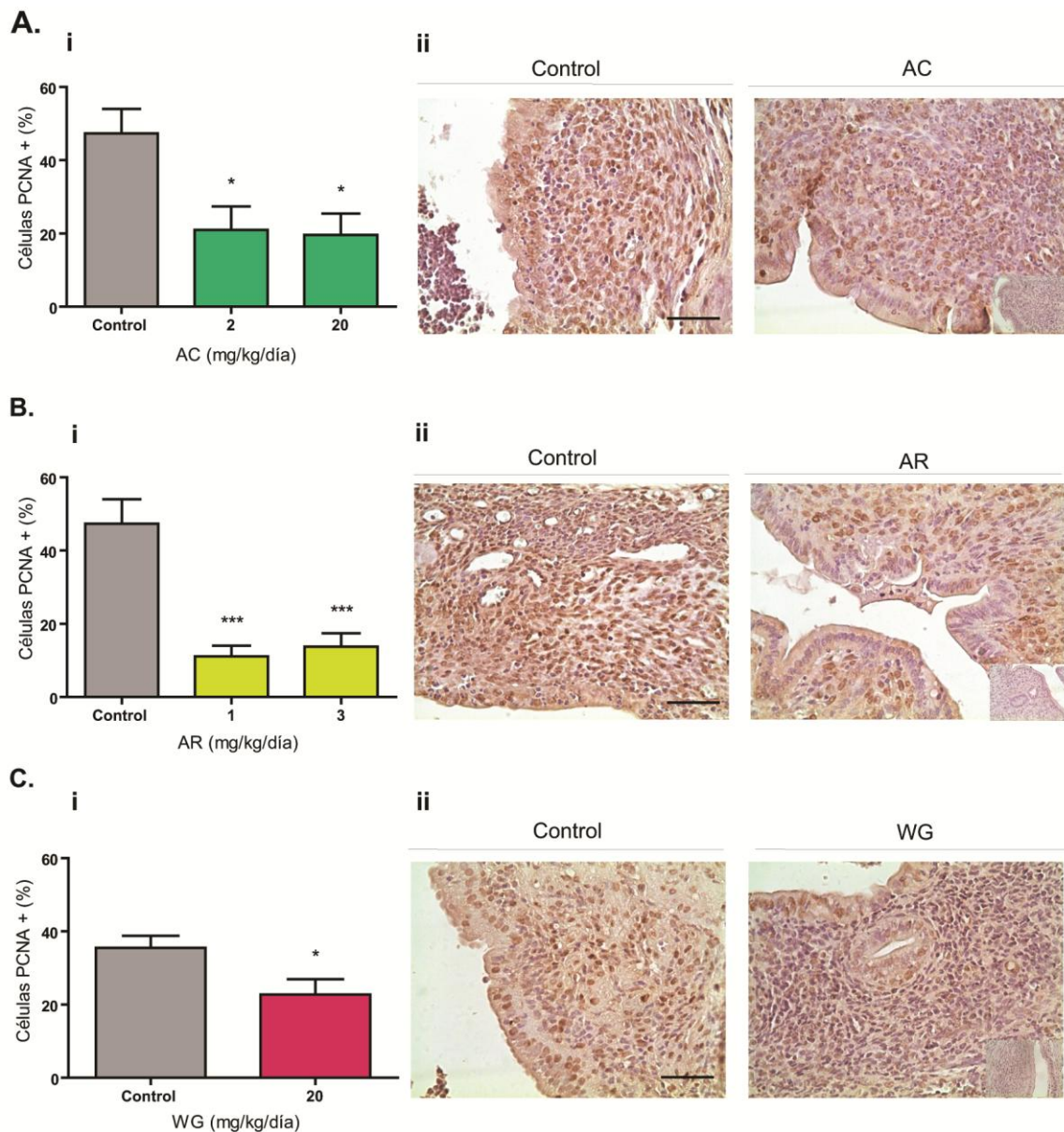


Figura 4.13.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la proliferación de células epiteliales y estromales en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón.

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Los animales se sacrificaron y las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron para evaluar la proliferación celular mediante inmunohistoquímica de PCNA luego de: **(A)** 14 días de tratamiento por vía i.p. con vehículo (control; n=8), 2 mg/kg/día (n=11) y 20 mg/kg/día AC (n=10) de; **(B)** 14 días de tratamiento por vía i.p. con vehículo (control; n=8), 1 mg/kg/día (n=11) y 3 mg/kg/día (n=10) de AR; **(C)** 12 días de tratamiento por v.o. con vehículo (control, n=11) y 20 mg/kg/día (n=12) de WG. (i) Se cuantificó el porcentaje de células PCNA+. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ vs. grupo control. (ii) Micrografías representativas de la inmunomarcación de PCNA. Recuadro: controles negativos sin el agregado del respectivo anticuerpo primario. Magnificación x400, escala: 50 μ m.

El ácido carnósico, el ácido rosmarínico y la wogonina inhibieron la proliferación celular en las lesiones endometriósicas en ratón.

Evaluación de la apoptosis en las lesiones endometriósicas

Luego del tratamiento con AC se observó un leve incremento del porcentaje de células TUNEL+ pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas comparado al grupo control (**Fig. 4.14.Ai**).

Por su parte, la dosis más alta del AR (3 mg/kg/día) incrementó significativamente el porcentaje de células TUNEL+ en las lesiones endometriósicas ($p < 0,05$ vs. grupo control, **Fig. 4.14.Bi**).

Por último y de manera similar a lo observado anteriormente, luego del tratamiento con WG (20 mg/kg/día) el porcentaje de células TUNEL+ fue significativamente superior respecto al grupo control ($p < 0,001$; **Fig. 4.14.Ci**).

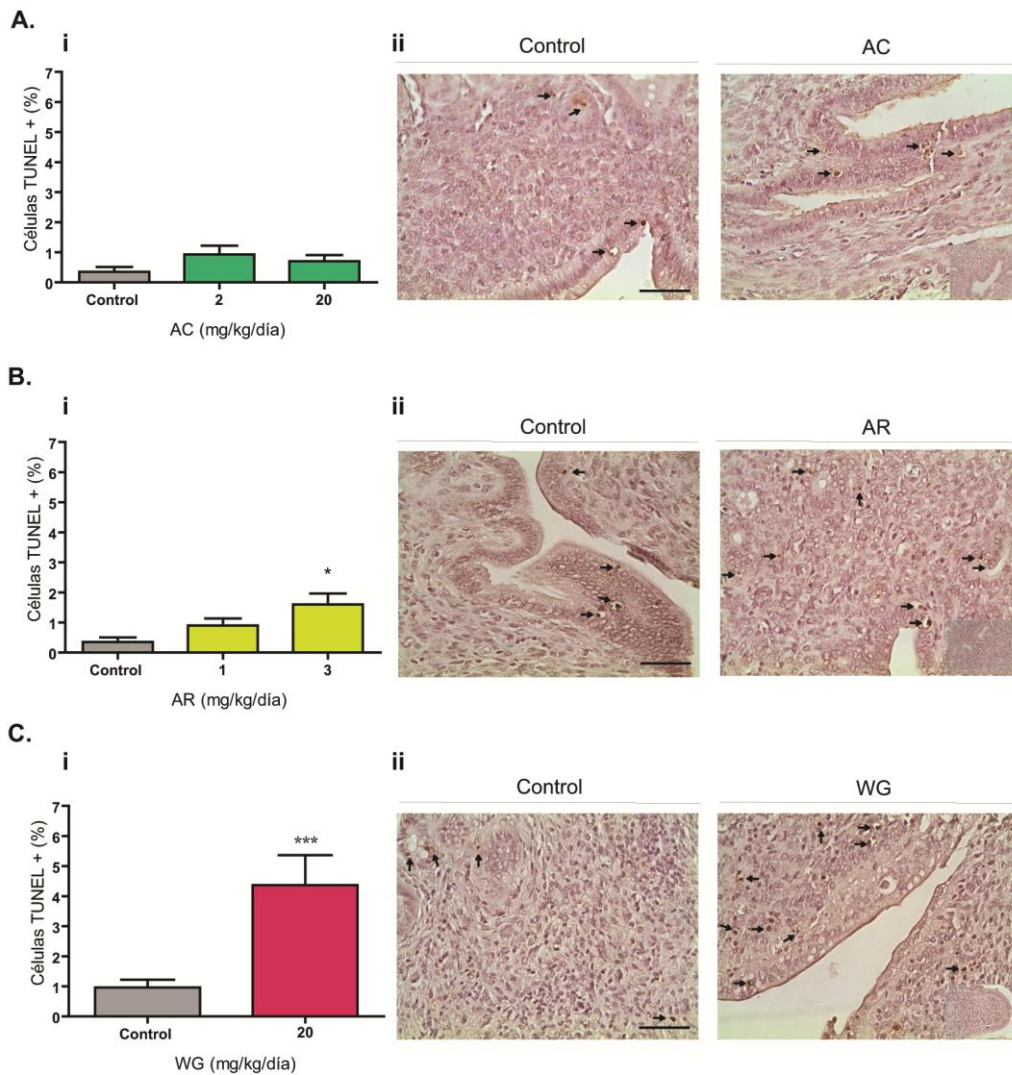


Figura 4.14.: Efecto del ácido carnósico (AC), ácido rosmarínico (AR) y wogonina (WG) sobre la muerte celular de células epiteliales y estromales en lesiones endometriósicas desarrolladas en ratón.

Los ratones se sometieron a una cirugía de inducción de la endometriosis. Los animales se sacrificaron y las lesiones desarrolladas se extirparon y fijaron para evaluar la muerte celular mediante la técnica de TUNEL luego de: **(A)** 14 días de tratamiento por vía i.p. con vehículo (control; n=8), 2 mg/kg/día (n=11) y 20 mg/kg/día (n=10) de AC; **(B)** 14 días de tratamiento por vía i.p. con vehículo (control; n=8), 1 mg/kg/día (n=11) y 3 mg/kg/día (n=10) de AR; **(C)** 12 días de tratamiento por v.o. con vehículo (control, n=11) y 20 mg/kg/día (n=12) de WG. **(i)** Se cuantificó el porcentaje de células TUNEL+. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ vs. grupo control. **(ii)** Micrografías representativas de la marcación de TUNEL. Recuadro: controles negativos, se incubaron en ausencia de la enzima TdT. Las flechas negras señalan células TUNEL+. Magnificación x400, escala: 50 μ m.

El ácido rosmarínico y la wogonina indujeron apoptosis en las lesiones endometriósicas en ratón.

5. Discusión

La endometriosis es una patología con una alta prevalencia e importantes implicancias por lo que requiere ser abordada desde las políticas de salud pública, la contención a las pacientes, la actualización y capacitación de médicos y la investigación básica.

Las terapias disponibles actualmente para tratar la endometriosis están dirigidas a atenuar las consecuencias de la enfermedad sin atacar sus causas y resultan ineficaces a largo plazo. El tratamiento estándar consiste en una intervención quirúrgica en la cual las lesiones endometriósicas son extirpadas seguido de un tratamiento hormonal destinado a generar un estado de hipoestrogenemia ¹⁶⁹. El tratamiento se complementa con analgésicos y antiinflamatorios de tipo AINEs para paliar el dolor. Sin embargo y como desventaja, el tratamiento conlleva severos efectos adversos y elevadas tasas de recurrencia (entre un 40-50%) cuando éste es interrumpido ^{14,168}. Por otro lado y paradójicamente, a pesar de que la infertilidad es un motivo de consulta frecuente por parte de las pacientes que padecen endometriosis, la imposibilidad de quedar embarazada durante el tratamiento es otro de los efectos indeseados de las terapéuticas actuales. Frente a estas limitaciones, la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan ser administradas por periodos prolongados sin perjudicar la salud de las pacientes y que además, dada su inocuidad, pudieran posibilitar la búsqueda de un embarazo durante su administración, resulta fundamental.

En los últimos años, la fitoterapia está siendo seriamente evaluada para el tratamiento de una multiplicidad de enfermedades. El hecho de que una diversidad de compuestos de origen vegetal puedan ser administrados por largo plazo sin conllevar efectos adversos resulta una ventaja sobre los tratamientos convencionales y promueven investigaciones científicas en campos relacionados con la fisiopatología humana ^{194,196}.

Si bien esta enfermedad es considerada benigna, la endometriosis implica un trastorno intrínseco en la proliferación celular similar a una neoplasia, donde las células poseen capacidad de invadir a distancia y desarrollar angiogénesis ¹⁷. Siendo así, la aplicación de estrategias utilizadas en la investigación de procesos tumorales provee de nuevas herramientas para abordar la terapéutica de la endometriosis.

En ese sentido, hace algunos años nuestro grupo ha comenzado una búsqueda de posibles fitoterapéuticos con demostrados efectos antitumorales para el control de

la endometriosis. Hemos estudiado el efecto de dos productos provenientes de los frutos rojos y del té verde: resveratrol y EGCG, que han resultado poseer claros efectos inhibitorios sobre el desarrollo de la endometriosis experimental ¹⁹⁹. La continuación de esta búsqueda, nos ha conducido a proponer el estudio de los compuestos bioactivos de dos especies vegetales con probados efectos terapéuticos beneficiosos en la terapéutica experimental del cáncer, el romero y la *Scutellaria baicalensis*.

Por lo tanto, decidimos iniciar esta investigación evaluando el efecto de tres de los potentes biocompuestos presentes en estas especies vegetales; ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina, sobre modelos experimentales de endometriosis. El ácido carnósico y el ácido rosmarínico son compuestos activos presentes en el extracto de hojas de romero y wogonina es un flavonoide proveniente de la raíz de *Scutellaria baicalensis*, una de las hierbas fundamentales utilizada en la medicina herbaria china.

El primer desafío fue evaluar el efecto de estos compuestos naturales sobre la proliferación de células estromales endometriales humanas. Para ello se establecieron cultivos primarios a partir de biopsias endometriales de mujeres controles y mujeres con endometriosis y a continuación fueron estimuladas con ácido carnósico, ácido rosmarínico o wogonina durante 24 horas.

Observamos que la concentración de 10 µg/ml de ácido carnósico indujo una inhibición significativa de la proliferación celular estromal endometrial en cultivos primarios generados tanto a partir de biopsias de mujeres control como de mujeres con endometriosis. La dosis inhibitoria efectiva de ácido rosmarínico fue 100 µg/ml, y 80 µM en el caso de wogonina.

Asimismo, hallamos que el patrón de inhibición de la proliferación celular observado en los cultivos obtenidos a partir de biopsias de pacientes con endometriosis y de mujeres del grupo control fue similar. Este comportamiento ya ha sido observado en otros trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio en los que no se hallaron diferencias significativas en los resultados de los distintos parámetros evaluados entre los cultivos provenientes del grupo control y de endometriosis ^{278,279}. Atribuimos estos efectos al posible hecho de que tanto las células que provienen de pacientes como las células endometriales de controles atravesaron por un proceso de digestión, separación y aislamiento, luego del cual fueron cultivadas y estimuladas. Esta manipulación provoca que la fracción de células estromales aisladas que estamos evaluando deje de estar influenciada por el microambiente en el cual se encontraba y responda de manera similar bajo un mismo estímulo en

condiciones experimentales independientemente de la condición de la paciente de donde provienen.

Habiendo comprobado el efecto antiproliferativo de los compuestos naturales sobre el cultivo primario de células estromales endometriales, nos preguntamos si se podría reproducir este resultado en un modelo experimental *in vitro* adicional, como es el de la línea celular estromal endometrial humana T-HESC.

Observamos que los tres compuestos fueron capaces de inhibir la proliferación celular en este modelo experimental. Cabe destacar que en este caso utilizamos un rango de concentraciones más amplio debido a la frecuente dificultad de obtener una respuesta efectiva de inhibición de la proliferación celular en las líneas celulares. Sin embargo, las concentraciones a las que se observó inhibición de la proliferación celular en las células T-HESC coincidieron mayormente con aquéllas que fueron efectivas sobre el cultivo primario. Esta propiedad antiproliferativa de ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre las células T-HESC concuerda con resultados reportados por otros autores utilizando otros tipos celulares^{210,215,242,248,280,281}.

Al respecto, Yesil-Celiktas y *col.* evaluaron el efecto del ácido carnósico y ácido rosmarínico sobre la proliferación de distintos tipos de líneas celulares tumorales humanas: células tumorales pulmonares (NCI-H82), líneas celulares establecidas a partir de carcinomas prostáticos (DU-145 y PC-3), carcinomas hepatocelulares (Hep-3B), células mieloides (K-562) y adenocarcinomas mamarios (MCF-7 y MDA-MB-231). Las concentraciones evaluadas para ambos compuestos partieron de 6,25 hasta 50 µg/ml. Los autores demostraron que el ácido carnósico ejerció una potente actividad antiproliferativa en todas las líneas evaluadas mientras que el ácido rosmarínico no fue efectivo a esas concentraciones²¹⁰. Estos resultados son coherentes con los efectos obtenidos en este trabajo en la línea T-HESC, para la cual fueron necesarias concentraciones más elevadas de ácido rosmarínico para conseguir un efecto similar al obtenido con ácido carnósico.

En lo que refiere a wogonina, hemos evaluado concentraciones en un rango de 20 µM hasta 160 µM sobre las células T-HESC. Observamos que la dosis mínima efectiva de wogonina fue 40 µM y dado que la concentración de 160 µM produjo el mismo efecto que la de 80 µM, los ensayos se continuaron utilizando esta última como máxima.

De manera similar y en concordancia con nuestros resultados, Yu y Kim demostraron un efecto antiproliferativo de wogonina sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 utilizando una dosis de 100 µM²⁸⁰. Asimismo, otros autores observaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales mamarias

(T47D, SK-BR-3 y MDA-MB-231) evaluando concentraciones que variaron desde 50 hasta 150 μM de wogonina²⁴⁸.

Debido a los resultados similares obtenidos en cuanto a proliferación celular entre los cultivos primarios y la línea celular T-HESC, y frente a las ventajas que confiere el manejo de una línea celular en comparación a un cultivo primario, la investigación se continuó evaluando otros parámetros en células T-HESC. Esta línea celular es utilizada por distintos grupos como modelo experimental para la investigación en endometriosis²⁵⁵⁻²⁵⁷.

La inhibición del ciclo celular y la inducción de apoptosis son dos estrategias destinadas a controlar el crecimiento celular en tejidos. A continuación decidimos evaluar si los efectos de los compuestos observados sobre la proliferación celular se podían explicar mediante la modulación de alguno de estos mecanismos.

Se comenzó evaluando el ciclo celular por citometría de flujo luego de la marcación del ADN con yoduro de propidio. Se trata de una técnica sencilla que permite reconocer el estadio del ciclo en el que se encuentra la célula según la cantidad de ADN existente. Una célula en G0/G1 posee la cantidad de ADN correspondiente a una célula diploide (2N) mientras que una célula que se encuentra en el estadio G2/M posee el doble de material genético (4N) ya que su ADN ha sido duplicado durante la fase de síntesis (S).

En este caso hemos estimulado las células T-HESC con los compuestos por 48 horas, y no por 24 como para los ensayos de proliferación celular, debido a que resultó ser el tiempo que consideramos apropiado luego de realizar curvas de puesta a punto en donde se compararon los efectos a 24, 48 y 72 horas. Por otro lado, para el tratamiento con ácido carnósico se usaron concentraciones menores a las que habían sido evaluadas en proliferación celular debido a que a 48 horas, las concentraciones más elevadas provocaban una menor adhesión de las células al plástico quedando la mayoría de ellas en suspensión.

Se sabe que a lo largo del ciclo, diferentes puntos de control censan el correcto funcionamiento de la célula y permiten su progresión. Un punto de control ubicado al finalizar la fase G2 alerta acerca de la posible replicación incorrecta del ADN o acerca de potenciales daños en el mismo. En caso de que los hubiera y que no hayan sido reparados, la célula activa mecanismos que impiden su entrada en mitosis. Como consecuencia, no se produce la división y la célula queda arrestada en ese estadio para mantenerse allí o gatillar las vías de muerte celular²⁸². Después del tratamiento

de las células estromales endometriales con ácido rosmarínico no se observaron alteraciones en el ciclo celular. Sin embargo, este efecto de arresto fue observado luego del tratamiento con ácido carnósico y wogonina. Los resultados mostraron una significativa disminución del porcentaje de células en el estadio G0/G1 acompañado de un incremento del porcentaje en el estadio G2/M.

Este mecanismo de inducción de arresto en G2/M resulta ser una buena estrategia para inhibir el crecimiento celular y ha sido observado al evaluar otros compuestos de origen natural con efectos antitumorales como por ejemplo Apigenina, un flavonoide presente en el apio, perejil y pomelo; N-Butylidenephthalide, un compuesto aislado de la raíz de *Angelica sinensis*, una hierba utilizada en la medicina china; y el extracto de la planta medicinal *Physalis angulata*, entre otros ²⁸³⁻²⁸⁶. Al conocer estos resultados decidimos profundizar el estudio evaluando por Western blot la expresión de proteínas que estuviesen directamente asociadas a la regulación del ciclo durante esa etapa.

La regulación del ciclo celular está estrictamente coordinada por proteínas, quinasas y fosfatasa, que actúan de manera simultánea. La quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1) y la Ciclina B1, conocida también como ciclina mitótica, forman un heterodímero; la activación de este complejo es indispensable para la entrada de la célula en mitosis. A su vez, para que haya activación de la CDK1, la misma tiene que estar fosforilada en el residuo de Treonina 161, la Ciclina B1 debe estar ensamblada y los residuos de Treonina 14 y Tirosina 15, desfosforilados ²⁸⁷. Además existen proteínas que inhiben la formación de este heterodímero como ser p21, p27 y p53 ^{282,288}.

Conociendo esta regulación evaluamos por Western blot la expresión de CDK1 (el anticuerpo utilizado reconoce la secuencia PSTAIRE que es aquella a la que la Ciclina B1 se acopla); Ciclina B1 y p21 sobre extractos de células T-HESC estimuladas durante 48 horas con ácido carnósico y wogonina.

Como se mostró en los resultados, no se observaron cambios significativos en la expresión de estas proteínas. El tratamiento con ácido carnósico indujo una tendencia a disminuir la expresión de CDK1 y Ciclina B1, lo que podría dar indicios de inhibición de la formación del complejo con la consiguiente inducción de arresto celular. Sin embargo, la expresión de p21 no se vio alterada.

Si bien luego del tratamiento con wogonina se observó una tendencia a incrementar la proteína p21, lo que podría contribuir al arresto celular inhibiendo la formación del complejo mitótico, observamos que contrariamente a lo esperado la expresión de CDK1 también se encontraba levemente incrementada. Si bien las

diferencias no fueron estadísticamente significativas, se ha visto que el aumento de CDK1 podría también asociarse a la inducción de apoptosis. Trabajos previos han reportado que un aumento en esta proteína resultaría en una entrada prematura en mitosis lo que provocaría catástrofe mitótica y la consecuente muerte por apoptosis²⁸⁷. Efectos similares han sido reportados con sustancias que inducen inhibición de WEE1, una quinasa que inactiva a CDK1, lo que provoca activación de la CDK1, un ingreso prematuro a mitosis y la consecuente catástrofe mitótica y apoptosis^{289,290}.

Si bien estos resultados no lograron aportar más evidencias a la regulación de la inducción de arresto celular en G2/M, el estudio de la modulación del ciclo celular es complejo y creemos que es necesaria la evaluación de más proteínas que participan de esta transición, como ser las quinasas (WEE1 y CAK) y fosfatasas (CDC25, PP2A) encargadas de activar o desactivar a la CDK1, así como también a otras proteínas inhibidoras de la formación del complejo CDK1-Ciclina B1 como ser p27 y p53. Por último, el uso de anticuerpos que reconozcan los sitios de fosforilación de la CDK1 también aportaría una información más precisa acerca de la activación de la enzima.

Aunque no hayamos podido dilucidar cuáles son las proteínas responsables de inducir los cambios observados sobre la progresión del ciclo celular causados por los tratamientos, trabajos realizados en otros modelos celulares dan sustento a nuestros resultados: Visanji y col. demostraron que el efecto antiproliferativo del ácido carnósico sobre células de adenocarcinoma epitelial colorectal está asociado a alteraciones en los niveles de Ciclina A y B1²⁹¹. Asimismo, un estudio publicado por Petiwala y col., evidenció que el extracto de romero es capaz de modular el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata induciendo arresto del ciclo en G1 y G2²⁹². Para el caso de wogonina, se reportó que un estímulo con 150 μ M del flavonoide fue capaz de inducir arresto de células MCF-7 en el estadio G2/M observándose una disminución de Ciclina B1, Ciclina A, CDK1, p-CDK1 (T161) y CDC25C y un incremento de p21 y p-CDK1 (T14/Y15)²⁹³.

Siguiendo con la etapa de identificación de posibles mecanismos que modulan el crecimiento celular, determinamos la presencia de células con contenido de ADN sub diploide mediante la técnica de tinción del ADN con yoduro de propidio. Observamos que los compuestos evaluados indujeron un incremento del porcentaje de células en sub-G1 dando indicios de inducción de apoptosis. Sin embargo, como esta técnica no es específica para la detección de apoptosis fue necesario complementar el estudio con la metodología *gold standard* para evaluar células en apoptosis que es la técnica de TUNEL. En este caso basándonos en resultados previamente reportados por otros

autores, realizamos estímulos tanto de 24 como de 48 horas con las dosis más altas de los compuestos que habían mostrado un efecto sobre la inhibición de la proliferación celular.

Los resultados evidenciaron la ausencia de células TUNEL positivas después del tratamiento con ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina. Si bien observamos que los compuestos, especialmente ácido carnósico y ácido rosmarínico, emiten fluorescencia *per se* sobre el canal correspondiente a FITC, luego del tratamiento no se halló una emisión de fluorescencia que superara la autofluorescencia de los mismos. Posiblemente este problema inherente a los compuestos evaluados podría estar encubriendo e imposibilitando la detección del pequeño porcentaje (4-10%) de células que estén muriendo por apoptosis de acuerdo a lo detectado en la evaluación de la fase sub-G1.

Al respecto, numerosos trabajos han descripto propiedades proapoptóticas *in vitro*, de estos compuestos naturales en distintos sistemas celulares^{214,216,220,293-295}. Min y col. observaron inducción de apoptosis en células de carcinoma renal luego de 24 horas de tratamiento con 13,1 µg/ml de ácido carnósico. El efecto fue evidenciado por aumento de la fase sub-G1, clivaje de PARP, detección de la fragmentación del ADN y aumento de la actividad de Caspasa 3²⁹⁴.

Además, López-Jiménez y col. demostraron mediante la técnica de TUNEL el efecto proapoptótico de ácido carnósico usando concentraciones que variaron entre 3,3 y 16,4 µg/ml sobre dos líneas celulares tumorales HL60 y HT1080 (células promielíticas de leucemia humana y células de fibrosarcoma, respectivamente)²¹⁴. En una línea de cáncer de ovario, el extracto de romero inhibió la proliferación celular modificando la expresión de múltiples genes que regulan la apoptosis entre otros mecanismos demostrados²¹⁶. Por su parte wogonina también evidenció efectos proapoptóticos en distintas líneas celulares tumorales^{280,293,295}. Por ejemplo en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, wogonina indujo apoptosis mediante la activación tanto de la vía mitocondrial como de la vía de receptores de muerte, observándose alteración de la proporción de las proteínas Bax y Bcl-2, activación de Caspasa 9 así como también degradación de la procaspasa 8, clivaje de Bid y de PARP²⁸⁰.

Nos interesó luego estudiar si el tratamiento con los compuestos naturales inducían la modificación del estado de óxido-reducción de las células T-HESC. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son subproductos del metabolismo del oxígeno que juegan un papel importante en la señalización celular²⁹⁶. La elevación persistente de ERO genera un desequilibrio que puede dañar macromoléculas y alterar las

funciones celulares. Esta condición se manifiesta en diversas enfermedades inflamatorias crónicas incluyendo la endometriosis ^{136,297}.

Los polifenoles son generalmente conocidos por su actividad antioxidante. Algunos de ellos actúan eliminando radicales libres o ejercen su actividad como interruptores de las reacciones radicales en cadena. A su vez son capaces de inhibir enzimas productoras de radicales de oxígeno y activar la transcripción de Nrf2, el principal regulador de las enzimas antioxidantes y desintoxicantes. Estas propiedades antioxidantes les proporcionan capacidades antiinflamatorias y quimiopreventivas ya que alivian los efectos secundarios de los citostáticos ^{195,298}.

Los resultados demostraron que el ácido carnósico y el ácido rosmarínico provocaron una disminución de la generación de ERO producida por las células T-HESC. El efecto del ácido carnósico fue muy leve sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el tratamiento con ácido rosmarínico disminuyó notoriamente la generación de ERO dando evidencia de una fuerte capacidad antioxidante del compuesto.

Si bien esta propiedad del romero ya se conocía y había sido reportada en distintos trabajos ^{299,300} es la primera vez que el efecto se demuestra sobre células endometriales identificando además los biocompuestos responsables de la actividad antioxidante. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo se reportaron sobre otros tipos celulares. Cattaneo y col. demostraron un efecto antioxidante del extracto de romero sobre células de melanoma ²⁶³. De manera similar, se demostró que el ácido rosmarínico fue capaz de disminuir los niveles de ERO en células endoteliales y en una línea de cáncer de colon utilizando concentraciones en un rango de 9 a 100 µg/ml ^{223,224}.

No obstante, los resultados obtenidos para wogonina resultaron ser diferentes a los recientemente explicados para ácido rosmarínico. Observamos que la dosis de 80 µM del flavonoide incrementó la generación de ERO y al realizar una coincubación del compuesto con una molécula de reconocida capacidad antioxidante (NAC), el efecto fue revertido. Paradójicamente, los resultados indicaron que wogonina ejerció un efecto prooxidante.

La investigación en biología y medicina nos enfrenta con numerosas aparentes contradicciones o paradojas que son de difícil interpretación y que valen la pena identificar para concentrar en ellas la atención. Esto se debe a la complejidad de los sistemas y elementos con los que trabajamos. Un ejemplo de estos efectos duales son los que provocan los flavonoides que si bien son comúnmente conocidos por su

actividad antioxidante, a su vez, numerosas publicaciones también demuestran sus propiedades prooxidantes^{293,301,302}.

Específicamente se reportó que wogonina produjo un efecto proapoptótico sobre células tumorales mamarias de la línea MCF-7 asociándose este efecto a la generación de ERO y a la activación de las vías de señalización ERK y p38 MAPK²⁸⁰. Otro trabajo demostró que una concentración de 10 μ M de wogonina fue capaz de inducir apoptosis de dos líneas celulares, A549 y HeLa (células tumorales pulmonares y células de cáncer de cuello uterino, respectivamente) a través de la acumulación intracelular de H₂O₂. Mediante este mecanismo wogonina también potenció el efecto del agente quimioterapéutico cisplatino³⁰³. Asimismo, el mecanismo prooxidante descrito por Baumann y col. se explica mediante la capacidad de wogonina de cambiar el radical libre \bullet O₂⁻ a un producto no radical más reducido H₂O₂. El H₂O₂ actúa como molécula de señalización; activa PLC γ 1, induce la liberación y acumulación de Ca²⁺ citosólico produciendo finalmente alteración de la membrana mitocondrial y apoptosis. Mediante este mecanismo wogonina fue capaz de inducir apoptosis selectivamente en linfocitos T malignos pero no en células T sanas de sangre periférica²⁴³.

En conclusión, la propiedad prooxidante de wogonina puede ser aprovechada para producir efectos citostáticos específicamente sobre las células cancerosas. La selectividad se debe a que éstas células, en comparación con las células normales, exhiben un aumento intrínseco de las ERO debido en parte a la estimulación oncogénica, al aumento de la actividad metabólica y al mal funcionamiento mitocondrial. Esta característica bioquímica proporciona una oportunidad ya que un incremento aún mayor de esos niveles oxidativos no sería tolerado por la célula y acabaría desencadenando un proceso apoptótico^{304,305}.

Si bien la endometriosis no es una enfermedad maligna, está descrito que las células endometriales ectópicas desarrollan mecanismos similares a los de una célula tumoral como ser la resistencia a la apoptosis, una exacerbada proliferación y la evasión del sistema inmune^{17,306}. El efecto prooxidante de wogonina podría resultar beneficioso en el tratamiento de la endometriosis para disparar mecanismos que eliminen selectivamente las células endometriósicas sin alterar las células normales. Futuros ensayos que permitan comparar el efecto de wogonina en células endometriales y endometriósicas serán de utilidad para aportar datos específicos de su propiedad diferencial para inducir apoptosis.

Si bien no hay antecedentes en el uso de ninguno de los compuestos que estudiamos sobre modelos de endometriosis, un trabajo publicado recientemente,

evidenció un efecto similar de otro flavonoide, la Apigenina, sobre líneas celulares de endometriosis humana. Los autores demostraron que el compuesto estimuló la producción de ERO y condujo a la peroxidación lipídica, lo que finalmente desencadenó en apoptosis a través de vías mitocondriales y mecanismos dependientes de ERO ³⁰⁷. Es importante destacar que, si bien hemos obtenido un efecto prooxidante luego del tratamiento con wogonina, no vimos una inducción marcada de la apoptosis *in vitro* en los tiempos y dosis evaluados. La complejidad del estudio de estos polifenoles radica en que su actividad biológica depende en gran medida de la dosis aplicada, el tipo de célula y el tiempo de exposición ²⁹⁸. Sería interesante poder continuar con este trabajo para estudiar otros modelos celulares o bien, modificar dosis y tiempos de incubación para así poder evaluar y comparar los mismos parámetros medidos en otras condiciones experimentales.

En lo que respecta el uso de anti/prooxidantes como posibles tratamientos para la endometriosis, la ecuación resulta compleja de evaluar. Un antioxidante sería capaz de restablecer el desbalance redox producido por un proceso inflamatorio, actuando positivamente, mejorando e inhibiendo dicha inflamación. Sin embargo, desde otro punto de vista, podría enlentecer o inhibir la apoptosis endometrial inducida por el aumento exacerbado de ERO, contribuir a la inestabilidad genómica e inducir transformación celular ^{149,150}. Sin duda, son necesarias más investigaciones que esclarezcan los mecanismos fisiopatológicos asociados a la endometriosis así como también los mecanismos moleculares por los cuales actúan esos compuestos. Estas respuestas serán clave a la hora de dilucidar qué tipo de terapéutica sería más apropiada para el tratamiento de la enfermedad.

Como ya se ha mencionado, la endometriosis es una enfermedad estrógeno dependiente. En base a esta condición, los tratamientos actuales están precisamente dirigidos a inhibir la síntesis de dicha hormona para controlar el crecimiento de las lesiones. Frente a la importancia de los estrógenos en esta enfermedad, el último parámetro evaluado sobre las células T-HESC fue la expresión de receptores de estrógeno y la secreción de estradiol.

Observamos que los compuestos bioactivos del romero no modificaron la expresión del ER α , indicando que los efectos observados sobre las células T-HESC, en cuanto a la inhibición de proliferación y supervivencia, no estarían mediados por este receptor. Este resultado concuerda con un trabajo de Einbond y col. en el cual se reportó que el ácido carnósico inhibió el crecimiento de células de cáncer de mama ER negativas ³⁰⁸. En otro trabajo más reciente se observó que la expresión del ER α fue

inhibida por el extracto de romero. Sin embargo, el efecto antitumoral fue observado tanto en células ER α positivas como negativas, indicando que dicho extracto actuaría también por vías de señalización independientes a los receptores de estrógeno. Además, los autores observaron que el extracto de romero potenció el efecto antitumoral de drogas quimioterapéuticas como el tamoxifeno, trastuzumab y paclitaxel²²⁵.

Para el caso de la wogonina hemos observado una disminución significativa de la expresión del receptor ER α . Estos resultados podrían estar asociados a los efectos de inhibición del crecimiento celular endometrial hallados en nuestro modelo. En concordancia, Chung y col. habían demostrado un efecto similar sobre células tumorales mamarias ER α positivas (T47D y MCF7). Sin embargo, los autores observaron que la inhibición de la proliferación celular inducida por wogonina (50–200 μ M) ocurría también en líneas ER α negativas, resultado que los condujo a concluir que la inhibición de la expresión del ER α estaría contribuyendo sólo en forma parcial a la reducción de la proliferación de células ER α positivas²⁴⁸.

Por otra parte, el receptor de estrógeno β (ER β) cumple un rol fundamental en la progresión de la endometriosis. Su expresión se ha visto preferentemente incrementada en células endometriales ectópicas participando de procesos antiapoptóticos, proinflamatorios y promoviendo la capacidad invasiva del tejido¹²⁵. Si bien en este trabajo no se ha podido evaluar el efecto de los compuestos sobre la expresión del ER β en células T-HESC por problemas de índole técnico, creemos que conocer el efecto de los mismos no sólo en esta línea celular sino también y especialmente en células estromales y epiteliales endometriósicas, aportaría valiosa información para conocer su modo de acción.

Para continuar, habiendo observado una disminución de la expresión del ER α luego del tratamiento con wogonina y conociendo la capacidad de las células endometriósicas de ingresar en un ciclo de retroalimentación positiva por el cual son capaces de secretar estradiol y promover su proliferación^{116,129}, decidimos evaluar los niveles de la hormona en los sobrenadantes de las células T-HESC que habían recibido el tratamiento con el flavonoide. Sin embargo, en contraposición a lo que esperábamos, no observamos diferencias en la concentración de estradiol entre los cultivos tratados y los basales.

Debido al predominante rol secretor que tienen las células epiteliales frente a las células estromales en las lesiones endometriósicas³⁰⁹, creemos que resultaría interesante evaluar los efectos de wogonina sobre la expresión de los receptores de

estrógeno y sobre la secreción de estradiol en células epiteliales endometriósicas, ya que posiblemente los niveles de esta hormona en los medios condicionados de la línea celular estromal se encuentren basalmente bajos y el tratamiento con wogonina no tenga efecto sobre su secreción.

Como ya mencionamos, uno de los principales síntomas de la endometriosis es el dolor pelviano crónico. Debido a que se reportó que los mastocitos están incrementados en las lesiones endometriósicas¹⁶⁰ y que cumplen un rol importante en muchas condiciones patológicas que involucran dolor crónico y dolor neuropático¹⁵⁸, nos resultó interesante evaluar a continuación el efecto de ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre el crecimiento de la línea celular de mastocitos HMC1.1. Con los antecedentes observados en las células estromales sobre la inducción del arresto celular, decidimos evaluar en HMC1.1 la expresión de 5 genes que participan activamente en la progresión de G2 a mitosis. Observamos un efecto similar al que habíamos visto sobre las células T-HESC. El ácido carnósico y la wogonina regularon la expresión de dichos genes, mientras que el ácido rosmarínico no provocó alteraciones. Específicamente se halló una disminución en la expresión de las ciclinas A2 y B1, de cdk1 y de cdc25a acompañado de un incremento significativo de la expresión de p21. Al estar inhibida la expresión de los genes responsables de la formación del complejo mitótico y aumentada la expresión de uno de los genes que regula negativamente la entrada en mitosis, este resultado es compatible con un posible arresto de los mastocitos en la fase G2/M, dato que aún resta por corroborar.

A nuestro conocer, no se han reportado hasta el momento efectos similares de estos compuestos sobre genes involucrados en la regulación del ciclo de HMC1.1. La investigación sobre este tipo celular se limita a un trabajo que demostró un efecto antiinflamatorio del extracto de *Scutellaria baicalensis* al inhibir la expresión de diversos mediadores inflamatorios en HMC1.1, reduciendo la producción de citoquinas inflamatorias y la activación de MAPK³¹⁰. Por otro lado, se ha observado que el ácido rosmarínico fue capaz de disminuir la proliferación de HMC1.1 activando mecanismos proapoptóticos y antiinflamatorios³¹¹.

En base a estos datos, sugerimos que sería importante continuar evaluando el efecto de los compuestos naturales sobre los mastocitos, haciendo hincapié en su activación y secreción de mediadores proinflamatorios, dado que la inhibición a ese nivel sería una buena estrategia para disminuir la inflamación y el dolor asociado a la endometriosis.

Si bien los modelos *in vitro* son de gran aporte y utilidad para el estudio de los mecanismos moleculares que desencadenan las células en respuesta a diversos estímulos, presentan limitaciones asociadas a la falta de interacción entre células de distintos linajes y a la interrelación de éstas con la matriz extracelular. Es por eso que en las investigaciones biomédicas el uso de animales de laboratorio representa un elemento fundamental en el desarrollo de importantes avances en el tratamiento de las enfermedades.

Por todo esto, y habiendo obtenido resultados sumamente interesantes en los modelos experimentales *in vitro*, nuestro último desafío fue complementar el estudio evaluando el efecto de los compuestos naturales *in vivo* en un modelo de endometriosis experimental desarrollado en ratón. Este modelo está ampliamente aceptado para el estudio de la enfermedad²⁵⁸⁻²⁶⁰ y ha sido utilizado en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio^{199,261,262}. Teniendo en cuenta la importancia del sistema inmunológico en la fisiopatología de la endometriosis, la utilización de ratones inmunocompetentes resulta ser una gran ventaja de este modelo.

Los resultados que obtuvimos fueron muy alentadores. El tratamiento con ácido carnósico indujo una disminución del 87% en el volumen de las lesiones desarrolladas en los ratones, resultado que podría explicarse al observar el potente efecto inhibitorio del compuesto sobre la proliferación de las células estromales y epiteliales que conforman dichas lesiones. Para el caso del ácido rosmarínico y wogonina, también observamos contundentes resultados en lo que respecta al tamaño de las lesiones desarrolladas. El ácido rosmarínico disminuyó un 80% el volumen de las mismas mientras que el tratamiento con wogonina indujo una reducción del 50%. En estos casos el resultado podría explicarse no sólo por la inhibición de la proliferación celular inducida por ambos polifenoles, sino también por la capacidad de incrementar el porcentaje de células apoptóticas en las lesiones, lo que estaría contribuyendo aún más a la disminución del volumen de las mismas.

Es importante destacar que los tratamientos no modificaron el número de lesiones desarrolladas por ratón. Este resultado no nos sorprendió ya que en nuestras condiciones experimentales es poco probable que un tratamiento elimine por completo las lesiones endometriósicas ya establecidas. El esquema de tratamiento elegido implicó iniciar el tratamiento una vez que las mismas estén desarrolladas ya que esa es la situación que resulta extrapolable a la condición en la que acceden las pacientes a la consulta médica. Si bien sería ideal contar con alguna estrategia preventiva de la enfermedad, las pacientes a las que se les diagnostica endometriosis tienen la

enfermedad instalada y el tratamiento que se le propone debe actuar inhibiendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas ya establecidas.

En trabajos previos en los que se evaluó el tiempo que necesitan las células endometriósicas para establecerse en un sitio ectópico y generar una lesión, se reportó que desde el día 1 las células del estroma de endometrio humano menstrual son capaces de adherirse al mesotelio en la cavidad peritoneal de ratones inmunosuprimidos, observándose posteriormente una reorganización progresiva de las células epiteliales y estromales en las glándulas endometriales. Al día 5 evidenciaron actividad proliferativa en células glandulares y una mayor expresión de VEGF en las células estromales en comparación con los trasplantes extirpados días anteriores ²⁷². En otro trabajo en el que se utilizó un modelo similar al anterior, los autores demostraron que la vascularización de las lesiones ocurrió entre 5 y 8 días después de la implantación ²⁷³.

Debido a estos antecedentes y dado a que el tratamiento con los compuestos naturales se inició 14 días después de la cirugía, resulta esperable, luego de un tratamiento tan corto, no observar cambios en el número de lesiones halladas. Sin embargo, en base a la contundencia en la disminución del volumen de las mismas, sugerimos que posiblemente un tratamiento más prolongado podría provocar un efecto a ese nivel.

Si nos centramos en el efecto inhibitor de crecimiento que produjeron los compuestos evaluados, podemos hallar antecedentes similares en trabajos publicados, que proporcionan una fuerte evidencia del efecto antitumoral de los mismos sobre diversos modelos animales. Un trabajo publicado recientemente resume las propiedades anticancerígenas *in vivo* de ácido carnósico y de ácido rosmarínico ²⁰⁸. Petiwala y col., reportaron que la administración oral de 100 mg/kg de extracto de romero durante 22 días disminuyó en un 46% el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata implantados en ratones atímicos ²⁹²; resultados similares se obtuvieron en un modelo de cáncer colorrectal ²²⁷. En otro trabajo, se observó que la administración intraperitoneal de 2 mg/kg de ácido rosmarínico durante 20 días redujo significativamente el peso de los tumores sólidos de carcinoma de pulmón desarrollados en ratones C57B/6, así como también inhibió eficazmente la metástasis tumoral ²²³.

En lo que respecta a wogonina, sus propiedades y efectos antitumorales *in vivo* también han sido estudiados ²⁴⁰. Baumann y col. observaron que wogonina fue capaz de suprimir el crecimiento de xenoinjertos de células T de leucemia humanas en ratones inmunodeficientes ²⁴³. Otro trabajo evidenció el efecto de wogonina,

administrada por vía oral, con una inhibición de hasta un 88% sobre el crecimiento de xenoinjertos humanos de cáncer de mama desarrollados en ratones desnudos atímicos ²⁴⁸. De manera similar, también en ratones BALB/c desnudos, el crecimiento de tumores MCF-7 xenotrasplantados se vio inhibido después de 21 días de tratamiento con LW-213, un flavonoide químicamente sintetizado derivado de la wogonina. LW-213 inhibió la proliferación celular en los tumores y alteró las proteínas reguladoras del ciclo celular ²⁴⁶.

Por último creemos que hubiese sido interesante haber podido evaluar el estado de óxido reducción en las lesiones endometriósicas desarrolladas en los ratones para establecer si el tratamiento con los compuestos naturales lo modificó de alguna manera; y de ser así, si pudo tener algún impacto sobre los resultados obtenidos en cuanto a proliferación celular y apoptosis.

A modo de cierre de la discusión de este trabajo podemos decir que los estudios citados a lo largo del trabajo definitivamente revelan la versatilidad de los compuestos naturales en la regulación de múltiples vías de señalización, todas ellas importantes en el desarrollo del cáncer ²⁰¹ así como también en la fisiopatología de la endometriosis. Sugerimos que los mecanismos por los cuales el ácido carnósico, el ácido rosmarínico y la wogonina ejercen su acción pueden ser diversos y dependen en gran medida de las dosis y tiempos evaluados en cada modelo.

Consideramos que este proceso de validación de productos naturales en fase preclínica es de gran contribución y promueve futuras investigaciones que den sustento al uso de estos compuestos como posibles estrategias terapéuticas para la endometriosis. La búsqueda de respaldo científico que contribuya a aprobar las creencias empíricas del uso de plantas medicinales constituiría el puntapié inicial para encarar futuros ensayos clínicos.

Si bien somos conscientes de la difícil tarea que resulta derribar los intereses económicos de diversos sectores, consideramos que el aporte de evidencias científicas que respalden la seguridad y eficacia del uso de estos compuestos naturales es el único camino que permitirá proponer a la fitoterapia como una valiosa herramienta terapéutica.

6. Conclusiones

En base a los antecedentes presentados, a los novedosos resultados obtenidos y a las consideraciones realizadas en la discusión de este trabajo de tesis doctoral, podemos considerar al ácido carnósico, al ácido rosmarínico y a la wogonina como prometedores agentes terapéuticos para el tratamiento de la endometriosis.

A modo de resumen (**Figura 6.1.**), observamos que los tres compuestos fueron capaces de producir una disminución de la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Complementariamente, observamos que, en cultivo, el ácido carnósico y la wogonina produjeron arresto del ciclo celular en G2/M aunque las proteínas responsables de regular este fenómeno no fueron identificadas. A pesar de observar un aumento de células en la fase sub-G1, no evidenciamos efectos significativos de los compuestos sobre la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, en los resultados obtenidos *in vivo* pudimos ver que además de la inhibición de la proliferación, hubo un aumento de los niveles de apoptosis en las lesiones endometriósicas luego del tratamiento con ácido rosmarínico y wogonina. Estos mecanismos serían los responsables de la disminución del volumen de las lesiones observada en los ratones. Al evaluar el rol de los estrógenos y su receptor alfa en los cultivos celulares demostramos que, si bien wogonina disminuyó la expresión del receptor, no se vio alterada la secreción de estradiol por parte de las células estromales, por lo cual sugerimos que la inhibición de la proliferación celular observada no estaría siendo mediada por esta vía. El resultado que creemos que ha sido más discutido ya que expone la dualidad en el mecanismo de acción de los polifenoles, fue el efecto antagónico entre ácido rosmarínico y wogonina respecto a la generación de ERO. Además, en la línea de mastocitos pudimos evidenciar un efecto de los compuestos sobre los genes involucrados en la regulación del ciclo celular. Los datos que se desprendan de la investigación de este modelo experimental podrían resultar de importancia en el estudio del tratamiento del dolor de las pacientes con endometriosis.

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que evalúa los efectos de ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina sobre el crecimiento de células estromales endometriales humanas y sobre el desarrollo de lesiones endometriósicas en un modelo murino. Sin perder de vista que queda mucho camino por recorrer, consideramos a estos resultados como promisorios ya que aportan contundentes evidencias que respaldan la búsqueda de potenciales tratamientos para la endometriosis.

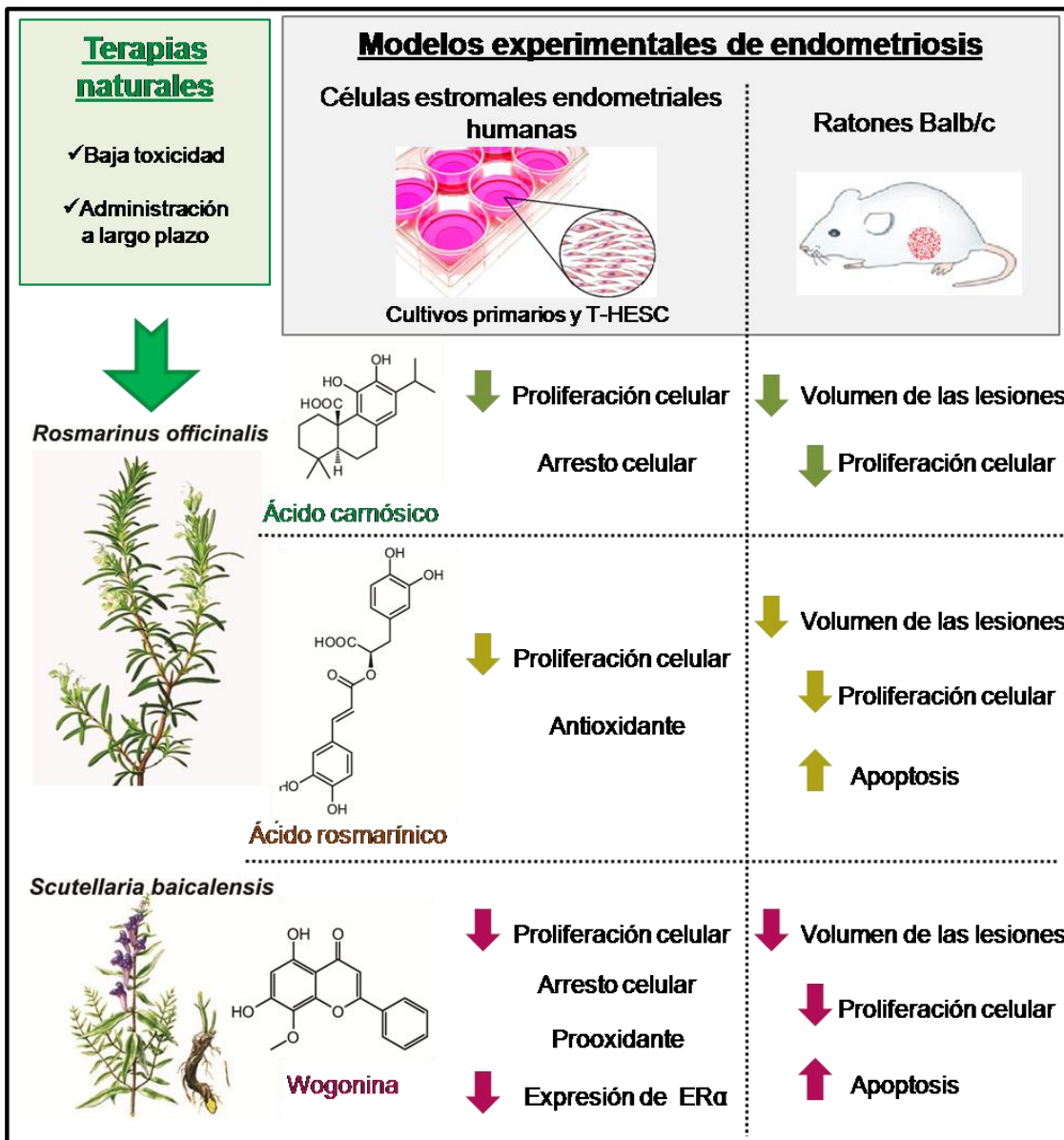


Figura 6.1.: Resumen de los principales efectos observados luego del tratamiento con ácido carnósico, ácido rosmarínico y wogonina en los modelos experimentales de endometriosis.

7. Referencias bibliográficas

1. Giudice, L. C. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 2389–2398 (2010).
2. Burney, R. O. & Giudice, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* 98, 511–519 (2012).
3. Vercellini, P., Vigano, P., Somigliana, E. & Fedele, L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 10, 261–275 (2014).
4. Boyle, D. P. & McCluggage, W. G. Peritoneal stromal endometriosis: A detailed morphological analysis of a large series of cases of a common and under-recognised form of endometriosis. *J. Clin. Pathol.* 62, 530–533 (2009).
5. Parasar, P., Ozcan, P. & Terry, K. L. Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. *Curr. Obstet. Gynecol. Rep.* 6, 34–41 (2017).
6. Hilaris, G. E., Payne, C. K., Osias, J., Cannon, W. & Nezhat, C. R. Synchronous rectovaginal, urinary bladder, and pulmonary endometriosis. *JSLs* 9, 78–82 (2005).
7. Capobianco, A. & Rovere-Querini, P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front. Immunol.* 4, 1–14 (2013).
8. Bulletti, C., Coccia, M. E., Battistoni, S. & Borini, A. Endometriosis and infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 441–447 (2010).
9. Eskenazi, B. & Warner, M. L. Epidemiology of endometriosis. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 24, 235–258 (1997).
10. Giudice, L. C. & Kao, L. C. Endometriosis. *Lancet* 364, 1789–1799 (2004).
11. D'Hooghe, T. M., Debrock, S., Hill, J. A. & Meuleman, C. Endometriosis and subfertility: Is the relationship resolved? *Semin. Reprod. Med.* 21, 243–253 (2003).
12. Valle, R. F. & Sciarra, J. J. Endometriosis: treatment strategies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 997, 229–239 (2003).
13. Ebert, A. D., Fuhr, N., David, M., Schnepfel, L. & Papadopoulos, T. 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.* 67, 158–161 (2009).
14. Guo, S.-W. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum. Reprod. Update* 15, 441–461 (2009).
15. Meuleman, C. *et al.* Surgical treatment of deeply infiltrating endometriosis with colorectal involvement. *Hum. Reprod. Update* 17, 311–326 (2011).
16. Ness, R. B. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189, 280–294 (2003).
17. Varma, R., Rollason, T., Gupta, J. K. & Maher, E. R. Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction* 127, 293–304 (2004).
18. McLeod, B. S. & Retzlaff, M. G. Epidemiology of endometriosis: An assessment of risk factors. *Clin. Obstet. Gynecol.* 53, 389–396 (2010).
19. Simoens, S. *et al.* The burden of endometriosis: Costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum. Reprod.* 27, 1292–1299 (2012).
20. Signorile, P. G. & Baldi, A. Endometriosis: New concepts in the pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 778–780 (2010).
21. Meyer, R. Ueber den stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome in allgemeinen und insbesondere iiber Adenomyositis serosoepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl. Gynakol.* 43, 745–750. (1919).
22. Nisolle, M. & Donnez, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.*

- 68, 585–596 (1997).
23. Jensen, J. R. & Coddington, C. C. Evolving spectrum: The pathogenesis of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 53, 379–388 (2010).
 24. Halban, J. Metastatic hysteroadenosis. *Wien klin Wochenschr* 37, 1205–1206. (1924).
 25. Sampson, J. A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am. J. Pathol.* 3, 93–110 (1927).
 26. Gazvani, R. & Templeton, A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 76, 117–126 (2002).
 27. Kao, A.-P. *et al.* Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model. *Fertil. Steril.* 95, 1308–1315 (2011).
 28. Sasson, I. & Taylor, H. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1127, 106–115 (2008).
 29. Nikoo, S. *et al.* Menstrual blood-derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 905–918 (2014).
 30. Du, H. & Taylor, H. S. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* 25, 2082–2086 (2007).
 31. Figueira, P. G. M., Abrão, M. S., Krikun, G., Taylor, H. S. & Taylor, H. Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1221, 10–17 (2011).
 32. Sampson, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 14, 422–469 (1927).
 33. Sampson, J. A. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 40, 549–557 (1940).
 34. Halme, J., Hammond, M. G., Hulka, J. F., Raj, S. G. & Talbert, L. M. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* 64, 151–154 (1984).
 35. Bartosik, D., Jacobs, S. L. & Kelly, L. J. Endometrial tissue in peritoneal fluid. *Fertil. Steril.* 46, 796–800 (1986).
 36. Kruitwagen, R. F. *et al.* Retrograde seeding of endometrial epithelial cells by uterine-tubal flushing. *Fertil. Steril.* 56, 414–420 (1991).
 37. Bruner-Tran, K. L., Webster-Clair, D. & Osteen, K. G. Experimental endometriosis: the nude mouse as a xenographic host. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 955, 328–39; discussion 340–2, 396–406 (2002).
 38. Bruner-Tran, K. L., Osteen, K. G. & Duleba, A. J. Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2489–2494 (2009).
 39. Bruner-Tran, K. L., Carvalho-Macedo, A. C., Duleba, A. J., Crispens, M. A. & Osteen, K. G. Experimental endometriosis in immunocompromised mice after adoptive transfer of human leukocytes. *Fertil. Steril.* 93, 2519–2524 (2010).
 40. Olive, D. L. & Henderson, D. Y. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet. Gynecol.* 69, 412–415 (1987).
 41. Sanfilippo, J. S., Wakim, N. G., Schikler, K. N. & Yussman, M. A. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154, 39–43 (1986).
 42. Aznaurova, Y. B., Zhumataev, M. B., Roberts, T. K., Aliper, A. M. & Zhavoronkov, A. a. Molecular aspects of development and regulation of endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 50 (2014).

43. Garai, J. *et al.* Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue. *Front. Biosci.* 11, 595–619 (2006).
44. Tariverdian, N. *et al.* Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: An interdisciplinary approach. *Semin. Immunopathol.* 29, 193–210 (2007).
45. Montgomery, G. W. *et al.* The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum. Reprod. Update* 14, 447–457 (2008).
46. Stratton, P. & Berkley, K. J. Chronic pelvic pain and endometriosis: Translational evidence of the relationship and implications. *Hum. Reprod. Update* 17, 327–346 (2011).
47. Milingos, S. *et al.* Laparoscopic management of patients with endometriosis and chronic pelvic pain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 997, 269–273 (2003).
48. Siedentopf, F., Tariverdian, N., Rücke, M., Kentenich, H. & Arck, P. C. Immune status, psychosocial distress and reduced quality of life in infertile patients with endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 60, 449–461 (2008).
49. Nnoaham, K. E. *et al.* Europe PMC Funders Group Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil. Steril.* 96, 366–373 (2011).
50. Halis, G. & Arici, A. Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1034, 300–315 (2004).
51. De Ziegler, D., Borghese, B. & Chapron, C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 376, 730–738 (2010).
52. Somigliana, E. *et al.* Surgical measures for endometriosis-related infertility: a plea for research. *Placenta* 32 Suppl 3, S238–242 (2011).
53. Gazvani, R. & Templeton, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 123, 217–226 (2002).
54. Oral, E., Arici, A., Olive, D. L. & Huszar, G. Peritoneal fluid from women with moderate or severe endometriosis inhibits sperm motility: the role of seminal fluid components. *Fertil. Steril.* 66, 787–792 (1996).
55. Lessey, B. A. *et al.* Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 643–649 (1994).
56. Wei, Q., St Clair, J. B., Fu, T., Stratton, P. & Nieman, L. K. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 91, 1686–1691 (2009).
57. Kennedy, S. *et al.* ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum. Reprod.* 20, 2698–2704 (2005).
58. Hickey, M., Ballard, K. & Farquhar, C. Endometriosis. *BMJ* 348, g1752 (2014).
59. Mounsey, A. L., Wilgus, A. & Slawson, D. C. Diagnosis and management of endometriosis. *Am. Fam. Physician* 74, 594–600 (2006).
60. Kyama, C. M. *et al.* Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. *Fertil. Steril.* 95, 1338–1343 (2011).
61. Mihalyi, A. *et al.* Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum. Reprod.* 25, 654–664 (2010).
62. Mabrouk, M. *et al.* Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 285, 1307–1312 (2012).
63. Bashti, O., Noruzinia, M., Garshasbi, M. & Abtahi, M. miR-31 and miR-145 as potential non-invasive regulatory biomarkers in patients with endometriosis. *Cell J.* 20, 84–89 (2018).
64. Greene, R., Stratton, P., Cleary, S. D., Ballweg, M. Lou & Sinaii, N. Diagnostic experience among 4,334 women reporting surgically diagnosed endometriosis. *Fertil. Steril.* 91, 32–39 (2009).

65. Laufer, M. R. Current approaches to optimizing the treatment of endometriosis in adolescents. *Gynecol. Obstet. Invest.* 66, 19–27 (2008).
66. Dun, E. C. *et al.* Endometriosis in adolescents. *J. Soc. Laparoendosc. Surg.* 19, e2015.00019 (2015).
67. ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil. Steril.* 67, 817–821 (1997).
68. Johnson, N. P. *et al.* World endometriosis society consensus on the classification of endometriosis. *Hum. Reprod.* 32, 315–324 (2017).
69. Bulun, S. E. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 360, 268–279 (2009).
70. Jiang, Q.-Y. & Wu, R.-J. Growth mechanisms of endometriotic cells in implanted places: a review. *Gynecol. Endocrinol.* 28, 562–567 (2012).
71. Sharpe-Timms, K. L. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 943, 131–147 (2001).
72. Ulukus, M., Cakmak, H. & Arici, A. The role of endometrium in endometriosis. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13, 467–476 (2006).
73. Meola, J. *et al.* Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 93, 1750–1773 (2010).
74. Chehna-Patel, N., Sachdeva, G., Gajbhiye, R., Warty, N. & Khole, V. ‘Spot’-ting differences between the ectopic and eutopic endometrium of endometriosis patients. *Fertil. Steril.* 94, 1964–1971 (2010).
75. Jones, R. K., Searle, R. F. & Bulmer, J. N. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum. Reprod.* 13, 3496–3502 (1998).
76. Gebel, H. M. *et al.* Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 69, 1042–1047 (1998).
77. Meresman, G. F. *et al.* Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil. Steril.* 77, 1141–1147 (2002).
78. Meresman, G. F. *et al.* Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil. Steril.* 84, 459–463 (2005).
79. Meresman, G. F. *et al.* Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 74, 760–766 (2000).
80. Johnson, M. C. *et al.* Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 45 (2005).
81. Harada, T. *et al.* Apoptosis and endometriosis. *Front. Biosci.* 12, 3140–3151 (2007).
82. Agic, A., Djalali, S., Diedrich, K. & Hornung, D. Apoptosis in endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 68, 217–223 (2009).
83. Nasu, K., Yuge, A., Tsuno, A., Nishida, M. & Narahara, H. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis. *Histol. Histopathol.* 24, 1181–1192 (2009).
84. Nasu, K. *et al.* Aberrant expression of apoptosis-related molecules in endometriosis. *Reprod. Sci.* 18, 206–218 (2011).
85. Izumi, G. *et al.* Involvement of immune cells in the pathogenesis of endometriosis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 44, 191–198 (2018).
86. Montagna, P. *et al.* Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation. *Fertil. Steril.* 90, 156–164 (2008).
87. Berbic, M. *et al.* Macrophage expression in endometrium of women with and without

- endometriosis. *Hum. Reprod.* 24, 325–332 (2009).
88. Braun, D. P., Gebel, H., Rotman, C., Rana, N. & Dmowski, W. P. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 57, 1203–1210 (1992).
 89. Raiter-Tenenbaum, A., Barañao, R. I., Etchepareborda, J. J., Meresman, G. F. & Rumi, L. S. Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 261, 147–157 (1998).
 90. Burns, K. A. *et al.* Early endometriosis in females is directed by immune-mediated estrogen receptor alpha and IL6 cross-talk. *Endocrinology* 159, 103–118 (2017).
 91. Vinatier, D., Dufour, P. & Oosterlynck, D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum. Reprod. Update* 2, 371–384 (1996).
 92. Shao, J. *et al.* Macrophages promote the growth and invasion of endometrial stromal cells by downregulating IL-24 in endometriosis. *Reproduction* 152, 673–682 (2016).
 93. Na, Y.-J. *et al.* Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of monocyte-specific chemokines by leukocytes. *Arch. Gynecol. Obstet.* 283, 1333–1341 (2011).
 94. Cao, X., Yang, D., Song, M., Murphy, A. & Parthasarathy, S. The presence of endometrial cells in the peritoneal cavity enhances monocyte recruitment and induces inflammatory cytokines in mice: implications for endometriosis. *Fertil. Steril.* 82 Suppl 3, 999–1007 (2004).
 95. Chuang, P.-C., Wu, M.-H., Shoji, Y. & Tsai, S.-J. Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *J. Pathol.* 219, 232–241 (2009).
 96. Chuang, P.-C. *et al.* Inhibition of CD36-dependent phagocytosis by prostaglandin E2 contributes to the development of endometriosis. *Am. J. Pathol.* 176, 850–860 (2010).
 97. Sun, J. C. & Lanier, L. L. Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur. J. Immunol.* 39, 2059–2064 (2009).
 98. Sun, J. C. & Lanier, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 645–657 (2011).
 99. Thiruchelvam, U., Wingfield, M. & O’Farrelly, C. Natural Killer cells: Key players in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 74, 291–301 (2015).
 100. Wu, M. Y. *et al.* Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 74, 1187–1191 (2000).
 101. Matsuoka, S. *et al.* Expression of inhibitory-motif killer immunoglobulin-like receptor, KIR2DL1, is increased in natural killer cells from women with pelvic endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 53, 249–254 (2005).
 102. Zhang, C. *et al.* Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen expression as immunodiagnostic parameters for pelvic endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 55, 106–114 (2006).
 103. Somigliana, E. *et al.* Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36, 295–300 (1996).
 104. Viganò, P. *et al.* Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 1150–1156 (1998).
 105. Kang, Y. J. *et al.* An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. *Hum. Reprod.* 29, 2176–2189 (2014).
 106. Yu, J. J. *et al.* IL15 promotes growth and invasion of endometrial stromal cells and inhibits killing activity of NK cells in endometriosis. *Reproduction* 152, 151–160 (2016).

107. Guo, S.-W., Du, Y. & Liu, X. Platelet-derived TGF- β 1 mediates the down-modulation of NKG2D expression and may be responsible for impaired natural killer (NK) cytotoxicity in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 31, 1462–1474 (2016).
108. Takamura, M. *et al.* Simultaneous detection and evaluation of four subsets of CD4+ T lymphocyte in lesions and peripheral blood in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 74, 480–486 (2015).
109. Osuga, Y. *et al.* Lymphocytes in Endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 1–10 (2011).
110. Paul Dmowski, W. & Braun, D. P. Immunology of endometriosis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18, 245–263 (2004).
111. Dmowski, W. P., Gebel, H. M. & Braun, D. P. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* 159, 7–14 (1994).
112. Szylo, K. *et al.* The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm.* 12, 131–138 (2003).
113. Garcia-Velasco, J. A., Mulayim, N., Kayisli, U. A. & Arici, A. Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 78, 855–859 (2002).
114. Bulun, S. E. *et al.* Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J. Reprod. Immunol.* 55, 21–33 (2002).
115. Kitawaki, J. *et al.* Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 149–155 (2002).
116. Bulun, S. E. *et al.* Aromatase and endometriosis. *Semin. Reprod. Med.* 22, 45–50 (2004).
117. Kitawaki, J. *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.* 57, 514–519 (1997).
118. Fujishita, A. *et al.* Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil. Steril.* 67, 856–864 (1997).
119. Wieser, F. *et al.* PROGINs receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil. Steril.* 77, 309–312 (2002).
120. Near, A. M. *et al.* Progesterone receptor gene polymorphisms and risk of endometriosis: results from an international collaborative effort. *Fertil. Steril.* 95, 40–45 (2011).
121. Attia, G. R. *et al.* Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2897–2902 (2000).
122. Burney, R. O. The genetics and biochemistry of endometriosis. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 25, 280–286 (2013).
123. Zhao, Y. *et al.* Dual suppression of estrogenic and inflammatory activities for targeting of endometriosis. *Sci. Transl. Med.* 7 (271), 271ra9 (2015).
124. Burns, K. A. *et al.* Role of estrogen receptor signaling required for endometriosis-like lesion establishment in a mouse model. *Endocrinology* 153, 3960–3971 (2012).
125. Han, S. J. *et al.* Estrogen Receptor β modulates apoptosis complexes and the inflammasome to drive the pathogenesis of endometriosis. *Cell* 163, 960–974 (2015).
126. Bulun, S. E. *et al.* Role of estrogen receptor- β in endometriosis serdar. *Semin Reprod Med.* 30, 39–45 (2012).
127. Banu, S. K., Lee, J., Speights, V. O., Starzinski-Powitz, A. & Arosh, J. A. Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinology* 149, 1180–1189 (2008).

128. Fagotti, A. *et al.* Analysis of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in different sites of endometriosis and correlation with clinico-pathological parameters. *Hum. Reprod.* 19, 393–397 (2004).
129. Noble, L. S. *et al.* Prostaglandin E₂ stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 600–606 (1997).
130. Attar, E. *et al.* Prostaglandin E₂ via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 623–631 (2009).
131. Bulun, S. E., Zeitoun, K. M., Takayama, K. & Sasano, H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 35–42 (2000).
132. Kim, J. J., Kurita, T. & Bulun, S. E. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr. Rev.* 34, 130–162 (2013).
133. Agarwal, A., Gupta, S. & Sharma, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 1–21 (2005).
134. Van Langendonck, A., Casanas-Roux, F. & Donnez, J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil. Steril.* 77, 861–870 (2002).
135. Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A. & Gupta, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 49 (2012).
136. Harlev, A., Gupta, S. & Agarwal, A. Targeting oxidative stress to treat endometriosis. *Expert Opin. Ther. Targets* 19, 1447–1464 (2015).
137. Podgaec, S. *et al.* Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum. Reprod.* 22, 1373–1379 (2007).
138. Szczepańska, M., Koźlik, J., Skrzypczak, J. & Mikołajczyk, M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil. Steril.* 79, 1288–1293 (2003).
139. Osborn, B. H., Haney, A. ., Misukonis, M. A. & Weinberg, J. B. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil. Steril.* 77, 46–51 (2002).
140. Wu, M.-Y. *et al.* Nitric oxide synthesis is increased in the endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 18, 2668–2671 (2003).
141. Pirdel, L. & Pirdel, M. Role of iron overload-induced macrophage apoptosis in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Reproduction* 147, 199-207(2014).
142. Kitawaki, J. *et al.* Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil. Steril.* 72, 1100–1106 (1999).
143. Nevzati E., Shafighi M., Bakhtian K.D., Treiber H., Fandino J., Fathi A.R Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells. *Acta Neurochir Suppl.* 120, 141–145 (2015)
144. Lousse, J.-C. *et al.* Iron storage is significantly increased in peritoneal macrophages of endometriosis patients and correlates with iron overload in peritoneal fluid. *Fertil. Steril.* 91, 1668–1675 (2009).
145. Van Langendonck, A., Casanas-Roux, F. & Donnez, J. Iron overload in the peritoneal cavity of women with pelvic endometriosis. *Fertil. Steril.* 78, 712–718 (2002).
146. Defrère, S. *et al.* Iron overload enhances epithelial cell proliferation in endometriotic lesions induced in a murine model. *Hum. Reprod.* 21, 2810–2816 (2006).
147. Liochev, S. I. The mechanism of Fenton-like reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met. Ions Biol. Syst.* 36, 1–39 (1999).
148. Scutiero, G. *et al.* Oxidative stress and endometriosis: a systematic review of the literature. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 7265238 (2017).

149. Carocho, M. & Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25 (2013).
150. Iwabuchi, T., Yoshimoto, C., Shigetomi, H. & Kobayashi, H. Oxidative stress and antioxidant defense in endometriosis and its malignant transformation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 848595 (2015).
151. Medina, M. G. & Lebovic, D. I. Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 88, 968–975 (2009).
152. Mechsner, S. *et al.* A pilot study to evaluate the clinical relevance of endometriosis-associated nerve fibers in peritoneal endometriotic lesions. *Fertil. Steril.* 92, 1856–1861 (2009).
153. Tokushige, N., Markham, R., Russell, P. & Fraser, I. S. Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum. Reprod.* 21, 3001–3007 (2006).
154. Arnold, J. *et al.* Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis. *Brain. Behav. Immun.* 26, 132–141 (2012).
155. Barcena de Arellano, M. L. *et al.* Influence of nerve growth factor in endometriosis-associated symptoms. *Reprod. Sci.* 18, 1202–1210 (2011).
156. Barcena de Arellano, M. L. *et al.* Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions. *Fertil. Steril.* 95, 1123–1126 (2011).
157. Stelekati, E., Orinska, Z. & Bulfone-Paus, S. Mast cells in allergy: Innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology* 212, 505–519 (2007).
158. Aich, A., Afrin, L. B. & Gupta, K. Mast cell-mediated mechanisms of nociception. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 29069–29092 (2015).
159. Kempuraj, D. *et al.* Increased numbers of activated mast cells in endometriosis lesions positive for corticotropin-releasing hormone and urocortin. *Am. J. Reprod. Immunol.* 52, 267–275 (2004).
160. Anaf, V. *et al.* Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. *Fertil. Steril.* 86, 1336–1343 (2006).
161. Sugamata, M., Ihara, T. & Uchiide, I. Increase of activated mast cells in human endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 53, 120–125 (2005).
162. Konno, R. *et al.* Role of immunoreactions and mast cells in pathogenesis of human endometriosis--morphologic study and gene expression analysis. *Hum. Cell* 16, 141–149 (2003).
163. Matsuzaki, S. *et al.* Increased mast cell density in peritoneal endometriosis compared with eutopic endometrium with endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40, 291–294 (1998).
164. Osuga, Y. *et al.* Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44, 231–235 (2000).
165. Graziottin, A. Perception of chronic pelvic pain in women: predictors and clinical implications. *Urologia* 75, 67–72 (2008).
166. Binda, M. M., Donnez, J. & Dolmans, M. M. Targeting mast cells: a new way to treat endometriosis. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 67–75 (2017).
167. Crosignani, P., Olive, D., Bergqvist, A. & Luciano, A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum. Reprod. Update* 12, 179–189 (2006).
168. Quaas, A. M., Weedin, E. A. & Hansen, K. R. On-label and off-label drug use in the treatment of endometriosis. *Fertil. Steril.* 103, 612–625 (2015).
169. Muñoz-Hernando, L. *et al.* Endometriosis: Alternative methods of medical treatment. *Int. J. Womens. Health* 7, 595–603 (2015).

170. Dunselman, G. A. J. *et al.* ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 29, 400–412 (2014).
171. Gianaroli, L. *et al.* Best practices of ASRM and ESHRE: A journey through reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 98, 1380–1394 (2012).
172. Abbott, J. *et al.* Laparoscopic excision of endometriosis: A randomized, placebo-controlled trial. *Fertil. Steril.* 82, 878–884 (2004).
173. Somigliana, E. *et al.* Surgical excision of endometriomas and ovarian reserve: A systematic review on serum antimüllerian hormone level modifications. *Fertil. Steril.* 98, 1531–1538 (2012).
174. Brown, J. & Farquhar, C. An overview of treatments for endometriosis. *JAMA* 313, 296–307 (2015).
175. Vercellini, P. *et al.* Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. *Drugs* 69, 649–675 (2009).
176. Rice, V. M. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 955, 343–352; discussion 389–93, 396–406 (2002).
177. Vercellini, P. *et al.* Progestogens for endometriosis: forward to the past. *Hum. Reprod. Update* 9, 387–396 (2003).
178. Schweppe, K. W. Current place of progestins in the treatment of endometriosis-related complaints. *Gynecol. Endocrinol.* 15 Suppl 6, 22–8 (2001).
179. Strowitzki, T. *et al.* Safety and tolerability of dienogest in endometriosis: pooled analysis from the European clinical study program. *Int. J. Womens. Health* 7, 391–401 (2015).
180. Harada, T. & Taniguchi, F. Dienogest: a new therapeutic agent for the treatment of endometriosis. *Womens. Health (Lond.)* 6, 27–35 (2010).
181. Ferrero, S., Alessandri, F., Racca, A. & Leone Roberti Maggiore, U. Treatment of pain associated with deep endometriosis: Alternatives and evidence. *Fertil. Steril.* 104, 771–792 (2015).
182. Seo, J. W., Lee, D. Y., Yoon, B. K. & Choi, D. S. Effects of long-term postoperative dienogest use for treatment of endometriosis on bone mineral density. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 212, 9–12 (2017).
183. Chang, S. P. & Ng, H. T. A randomized comparative study of the effect of leuprorelin acetate depot and danazol in the treatment of endometriosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 57, 431–437 (1996).
184. Fraser, I. S., Shearman, R. P., Jansen, R. P. & Sutherland, P. D. A comparative treatment trial of endometriosis using the gonadotrophin-releasing hormone agonist, nafarelin, and the synthetic steroid, danazol. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 31, 158–163 (1991).
185. Telimaa, S., Rönnerberg, L. & Kauppila, A. Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis after conservative surgery. *Gynecol. Endocrinol.* 1, 363–371 (1987).
186. Rotondi, M. *et al.* Depot leuprorelin acetate versus danazol in the treatment of infertile women with symptomatic endometriosis. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 23, 523–526 (2002).
187. Jana, N. R. NSAIDs and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1295–1301 (2008).
188. Attar, E. & Bulun, S. E. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil. Steril.* 85, 1307–1318 (2006).
189. Ferrero, S., Gillott, D. J., Venturini, P. L. & Remorgida, V. Use of aromatase inhibitors to treat endometriosis-related pain symptoms: a systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 89 (2011).
190. Olivares, C. *et al.* Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum. Reprod.* 23, 2701–2708 (2008).

191. Ricci, A. G., Olivares, C. N., Bilotas, M. A., Meresman, G. F. & Barañao, R. I. Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod. Sci.* 18, 614–622 (2011).
192. Epstein, R. J. VEGF signaling inhibitors: more pro-apoptotic than anti-angiogenic. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 443–452 (2007).
193. Yao, Z. *et al.* Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds. *J. Invest. Surg.* 18, 177–183 (2005).
194. Shanmugam, M. K., Kannaiyan, R. & Sethi, G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. *Nutr. Cancer* 63, 161–173 (2011).
195. Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F. & Osborn, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2821–2831 (2013).
196. Chinembiri, T. N., Du Plessis, L. H., Gerber, M., Hamman, J. H. & Du Plessis, J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules* 19, 11679–11721 (2014).
197. Bak, M. J., Das Gupta, S., Wahler, J. & Suh, N. Role of dietary bioactive natural products in estrogen receptor-positive breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 40–41, 170–191 (2016).
198. Wieser, F., Wu, J., Shen, Z., Taylor, R. N. & Sidell, N. Retinoic acid suppresses growth of lesions, inhibits peritoneal cytokine secretion, and promotes macrophage differentiation in an immunocompetent mouse model of endometriosis. *Fertil. Steril.* 97, 1430–1437 (2012).
199. Ricci, A. G. *et al.* Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis. *Hum. Reprod.* 28, 178–188 (2013).
200. Miyashita, M. *et al.* Effects of 1,25-Dihydroxy vitamin D3 on endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 2371–2379 (2016).
201. Ovadje, P. *et al.* Advances in the research and development of natural health products as main stream cancer therapeutics. *Evid. based Complement. Altern. Med.* 2015, 751348 (2015).
202. Darshan, S. & Doreswamy, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytother. Res.* 18, 343–357 (2004).
203. Ulbricht, C. *et al.* An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the natural standard research collaboration. *J. Diet. Suppl.* 7, 351–413 (2010).
204. Molaes, S. & Ladio, A. Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: use patterns on a regional scale. *J. Ethnopharmacol.* 122, 251–260 (2009).
205. Molaes, S. & Ladio, A. Medicinal plants in the cultural landscape of a Mapuche-Tehuelche community in arid Argentine Patagonia: an eco-sensorial approach. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 10, 61 (2014).
206. Pérez-Fons, L., Garzón, M. T. & Micol, V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J. Agric. Food Chem.* 58, 161–171 (2010).
207. Mengoni, E. S. *et al.* Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia* 82, 414–421 (2011).
208. Moore, J., Yousef, M. & Tsiani, E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients* 8, E731 (2016).
209. Birtić, S., Dussort, P., Pierre, F.-X., Bily, A. C. & Roller, M. Carnosic acid. *Phytochemistry* 115, 9–19 (2015).

210. Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 158–163 (2010).
211. Petiwala, S. M. & Johnson, J. J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Lett.* 367, 93–102 (2015).
212. González-Trujano, M. E. *et al.* Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 111, 476–482 (2007).
213. Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S. & Towiwat, P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 67–73 (2014).
214. López-Jiménez, A., García-Caballero, M., Medina, M. Á. & Quesada, A. R. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur. J. Nutr.* 52, 85–95 (2013).
215. Cheung, S. & Tai, J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol. Rep.* 17, 1525–1531 (2007).
216. Tai, J., Cheung, S., Wu, M. & Hasman, D. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells *in vitro*. *Phytomedicine* 19, 436–443 (2012).
217. Park, S. Y. *et al.* Carnosic acid inhibits the epithelial-mesenchymal transition in B16F10 melanoma cells: a possible mechanism for the inhibition of cell migration. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 12698–12713 (2014).
218. Barni, M. V., Carlini, M. J., Cafferata, E. G., Puricelli, L. & Moreno, S. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* 27, 1041–1048 (2012).
219. Kim, D.-H. *et al.* Carnosic acid inhibits STAT3 signaling and induces apoptosis through generation of ROS in human colon cancer HCT116 cells. *Mol. Carcinog.* 55, 1096–1110 (2016).
220. Kar, S., Palit, S., Ball, W. B. & Das, P. K. Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF- κ B signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis* 17, 735–747 (2012).
221. Cortese, K. *et al.* Carnosic acid induces proteasomal degradation of Cyclin B1, RB and SOX2 along with cell growth arrest and apoptosis in GBM cells. *Phytomedicine* 23, 679–685 (2016).
222. Valdés, A., Artemenko, K. A., Bergquist, J., García-Cañas, V. & Cifuentes, A. Comprehensive proteomic study of the antiproliferative activity of a polyphenol-enriched rosemary extract on colon cancer cells using nanoliquid chromatography-Orbitrap MS/MS. *J. Proteome Res.* 15, 1971–1985 (2016).
223. Xu, Y., Xu, G., Liu, L., Xu, D. & Liu, J. Anti-invasion effect of rosmarinic acid via the extracellular signal-regulated kinase and oxidation-reduction pathway in Ls174-T cells. *J. Cell. Biochem.* 111, 370–379 (2010).
224. Huang, S. & Zheng, R. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett.* 239, 271–280 (2006).
225. González-Vallinas, M. *et al.* Modulation of estrogen and epidermal growth factor receptors by rosemary extract in breast cancer cells. *Electrophoresis* 35, 1719–1727 (2014).
226. Petiwala, S. M., Puthenveetil, A. G. & Johnson, J. J. Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer. *Front. Pharmacol.* 4, 29 (2013).

227. Ngo, S. N. T., Williams, D. B. & Head, R. J. Rosemary and cancer prevention: Preclinical perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 946–954 (2011).
228. Flower, A., Liu, J. P., Chen, S., Lewith, G. & Little, P. Chinese herbal medicine for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 3, CD006568 (2009).
229. Wieser, F. *et al.* Evolution of medical treatment for endometriosis: Back to the roots? *Hum. Reprod. Update* 13, 487–499 (2007).
230. Stephens, L., Whitehouse, J. & Polley, M. Western herbal medicine, epigenetics, and endometriosis. *J. Altern. Complement. Med.* 19, 853–859 (2013).
231. Su, S. Y., Muo, C. H., Sung, F. C. & Morisky, D. E. Reduction of surgery rate in endometriosis patients who take Chinese medicine: A population-based retrospective cohort study. *Complement. Ther. Med.* 22, 632–639 (2014).
232. Ried, K. Chinese herbal medicine for female infertility: An updated meta-analysis. *Complement. Ther. Med.* 23, 116–128 (2015).
233. Flower, A., Liu, J. P., Lewith, G., Little, P. & Li, Q. Chinese herbal medicine for endometriosis. *Cochrane database Syst. Rev.* 5, CD006568 (2012).
234. Ried, K. & Stuart, K. Efficacy of Traditional Chinese Herbal Medicine in the management of female infertility: A systematic review. *Complement. Ther. Med.* 19, 319–331 (2011).
235. Li, C., Lin, G. & Zuo, Z. Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellariae* and its bioactive flavones. *Biopharm. Drug Dispos.* 32, 427–445 (2011).
236. Li-Weber, M. Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett.* 332, 374–382 (2013).
237. Zhao, Q. *et al.* Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF- κ B and regulation of its metabolism. *Toxicol. Lett.* 197, 201–210 (2010).
238. Gurung, S. K., Kim, H. P. & Park, H. Inhibition of prostaglandin E2 production by synthetic Wogonin analogs. 32, 1503–1508 (2009).
239. Li-Weber, M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat. Rev.* 35, 57–68 (2009).
240. Wu, X., Zhang, H., Salmani, J. M. M., Fu, R. & Chen, B. Advances of wogonin, an extract from *Scutellaria baicalensis*, for the treatment of multiple tumors. *Onco. Targets. Ther.* 9, 2935–2943 (2016).
241. Chirumbolo, S. Anticancer properties of the flavone wogonin. *Toxicology* 314, 60–64 (2013).
242. Parajuli, P., Joshee, N., Rimando, A. M., Mittal, S. & Yadav, A. K. *In vitro* antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta Med.* 75, 41–48 (2009).
243. Baumann, S. *et al.* Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC γ 1 and Ca $^{2+}$ dependent apoptosis. *Blood* 111, 2354–2363 (2008).
244. Chen, S. *et al.* Combined activity of oridonin and wogonin in advanced-stage ovarian cancer cells: Sensitivity of ovarian cancer cells to phyto-active chemicals. *Cell Biol. Toxicol.* 27, 133–147 (2011).
245. Chen, X.-M. *et al.* Wogonin has multiple anti-cancer effects by regulating c-Myc/SKP2/Fbw7 α and HDAC1/HDAC2 pathways and inducing apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549. *PLoS One* 8, e79201 (2013).
246. Zhao, L. *et al.* LW-213 induces G2/M cell cycle arrest through AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 55, 778–792 (2016).

247. Wang, C. Z. *et al.* Hydrophobic flavonoids from *Scutellaria baicalensis* induce colorectal cancer cell apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway. *Int. J. Oncol.* 42, 1018–1026 (2013).
248. Chung, H. *et al.* Anticancer effects of wogonin in both estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines *in vitro* and in nude mice xenografts. *Int. J. Cancer* 122, 816–822 (2008).
249. Huang, K. F., Zhang, G. D., Huang, Y. Q. & Diao, Y. Wogonin induces apoptosis and down-regulates survivin in human breast cancer MCF-7 cells by modulating PI3K-AKT pathway. *Int. Immunopharmacol.* 12, 334–341 (2012).
250. Safdari, Y., Khalili, M. & Ali, M. Natural inhibitors of PI3K/AKT signaling in breast cancer: Emphasis on newly-discovered molecular mechanisms of action. *Pharmacol. Res.* 93, 1–10 (2015).
251. Lu, N. *et al.* Wogonin suppresses tumor growth *in vivo* and VEGF-induced angiogenesis through inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR2. *Life Sci.* 82, 956–963 (2008).
252. Chi, Y. S. & Kim, H. P. Suppression of cyclooxygenase-2 expression of skin fibroblasts by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 72, 59–66 (2005).
253. Zhu, L., Li, L., Li, Y., Wang, J. & Wang, Q. Chinese herbal medicine as an adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2016, 9469276 (2016).
254. Kummar, S. *et al.* A phase I study of the chinese herbal medicine PHY906 as a modulator of irinotecan-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 10, 85–96 (2011).
255. Chiappini, F. *et al.* Enhanced cyclooxygenase-2 expression levels and metalloproteinase 2 and 9 activation by Hexachlorobenzene in human endometrial stromal cells. *Biochem. Pharmacol.* 109, 91–104 (2016).
256. Eyster, K. M. *et al.* Reciprocal Communication Between Endometrial Stromal Cells and Macrophages. *Reprod. Sci.* 17, 809–822 (2010).
257. Annunziata, M. *et al.* The growth hormone–releasing hormone (GHRH) antagonist JV-1-36 inhibits proliferation and survival of human ectopic endometriotic stromal cells (ESCs) and the T HESC cell line. *Fertil. Steril.* 94, 841–849 (2010).
258. Cuevas, M. *et al.* Stress exacerbates endometriosis manifestations and inflammatory parameters in an animal model. *Reprod. Sci.* 19, 851–862 (2012).
259. Fang, Z. *et al.* Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3460–3466 (2002).
260. Huniadi, C. A., Pop, O. L., Antal, T. A. & Stamatian, F. The effects of ulipristal on Bax/Bcl-2, cytochrome C, Ki-67 and cyclooxygenase-2 expression in a rat model with surgically induced endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 169, 360–365 (2013).
261. Olivares, C. N., Bilotas, M. A., Ricci, A. G., Baranao, R. I. & Meresman, G. F. Anastrozole and celecoxib for endometriosis treatment, good to keep them apart. *Reproduction* 145, 119–126 (2013).
262. Bilotas, M. A. *et al.* Interplay between endometriosis and pregnancy in a mouse model. *PLoS One* 10, 1–15 (2015).
263. Cattaneo, L. *et al.* Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PLoS One* 10, 1–18 (2015).
264. Allen, R. T., Hunter, W. J. & Agrawal, D. K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 37, 215–228 (1997).

265. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
266. Rossi, S. P. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) production triggered by prostaglandin D2 (PGD2) regulates lactate dehydrogenase (LDH) expression/activity in TM4 Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 434, 154–165 (2016).
267. Greaves, E., Grieve, K., Horne, A. W. & Saunders, P. T. K. Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E1738–E1743 (2014).
268. Greaves, E. *et al.* EP2 receptor antagonism reduces peripheral and central hyperalgesia in a preclinical mouse model of endometriosis. *Sci. Rep.* 7, 44169 (2017).
269. Olivares, C., Ricci, A., Bilotas, M., Barañao, R. I. & Meresman, G. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil. Steril.* 96, 428–433 (2011).
270. Bilotas, M., Meresman, G., Stella, I., Sueldo, C. & Barañao, R. I. Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. *Fertil. Steril.* 93, 2513–2518 (2010).
271. Bastón, J. I. *et al.* Targeting galectin-1-induced angiogenesis mitigates the severity of endometriosis. *J. Pathol.* 234, 329–337 (2014).
272. Nisolle, M., Casanas-Roux, F. & Donnez, J. Early-stage endometriosis: Adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil. Steril.* 74, 306–312 (2000).
273. Eggermont, J., Donnez, J., Casanas-Roux, F., Scholtes, H. & Van Langendonck, A. Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertil. Steril.* 84, 492–499 (2005).
274. Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L. & Taft, R. A. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 7, 1–5 (2012).
275. Brodie, A., Jelovac, D. & Long, B. J. Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. *Clin. Cancer Res.* 9, 455S–459S (2003).
276. Ogata, K., Kurki, P., Celis, J. E., Nakamura, R. M. & Tan, E. M. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp. Cell Res.* 168, 475–486 (1987).
277. Pozarowski, P. & Darzynkiewicz, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 281, 301–311 (2004).
278. Meresman, G. F. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 80, 702–707 (2003).
279. Bilotas, M. *et al.* 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.* 22, 644–653 (2007).
280. Yu, J. S. & Kim, A. K. Wogonin induces apoptosis by activation of ERK and p38 MAPKs signaling pathways and generation of reactive oxygen species in human breast cancer cells. *Mol. Cells* 31, 327–335 (2011).
281. Kavandi, L. *et al.* The Chinese herbs *Scutellaria baicalensis* and *Fritillaria cirrhosa* target NFκB to inhibit proliferation of ovarian and endometrial cancer cells. *Mol. Carcinog.* 54, 368–378 (2015).
282. Berthet, C. & Kaldis, P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 26, 4469–4477 (2007).
283. Ujiki, M. B. *et al.* Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell

- cycle arrest. *Mol. Cancer* 5, 76 (2006).
284. Su, Y.-J., Huang, S.-Y., Ni, Y.-H., Liao, K.-F. & Chiu, S.-C. Anti-Tumor and radiosensitization effects of N-Butylideneephthalide on human breast cancer cells. *Molecules* 23, 240 (2018).
285. Hsieh, W. T., Huang, K. Y., Lin, H. Y. & Chung, J. G. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 44, 974–983 (2006).
286. Duangprompo, W., Aree, K., Itharat, A. & Hansakul, P. Effects of 5,6-dihydroxy-2,4-dimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma cells. *Am. J. Chin. Med.* 44, 1473–1490 (2016).
287. Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T. & Kroemer, G. Cyclin-dependent kinase-1: Linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 9, 1287–1293 (2002).
288. Bendris, N., Lemmers, B. & Blanchard, J. M. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle* 14, 1786–1798 (2015).
289. Wang, Z. *et al.* Radiosensitization of metformin in pancreatic cancer cells via abrogating the G2 checkpoint and inhibiting DNA damage repair. *Cancer Lett.* 369, 192–201 (2015).
290. Chen, B., Duan, L., Yin, G., Tan, J. & Jiang, X. miR-381, a novel intrinsic WEE1 inhibitor, sensitizes renal cancer cells to 5-FU by up-regulation of Cdc2 activities in 786-O. *J. Chemother.* 25, 229–238 (2013).
291. Visanji, J. M., Thompson, D. G. & Padfield, P. J. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett.* 237, 130–136 (2006).
292. Petiwala, S. M. *et al.* Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract modulates CHOP/GADD153 to promote androgen receptor degradation and decreases xenograft tumor growth. *PLoS One* 9, e89772 (2014).
293. Tao, L. *et al.* LL-202, a newly synthesized flavonoid, inhibits tumor growth via inducing G2/M phase arrest and cell apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Toxicol. Lett.* 228, 1–12 (2014).
294. Min, K.-J., Jung, K.-J. & Kwon, T. K. Carnosic acid induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress induction in human renal carcinoma Caki Cells. *J. cancer Prev.* 19, 170–178 (2014).
295. Qian, C. *et al.* Wogonin-enhanced reactive oxygen species-induced apoptosis and potentiated cytotoxic effects of chemotherapeutic agents by suppression Nrf2-mediated signaling in HepG2 cells. *Free Radic. Res.* 48, 607–621 (2014).
296. Forman, H. J., Maiorino, M. & Ursini, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49, 835–842 (2010).
297. Ngô, C. *et al.* Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am. J. Pathol.* 175, 225–234 (2009).
298. Stepanic, V., Gasparovic, A., Troselj, K., Amic, D. & Zarkovic, N. Selected attributes of polyphenols in targeting oxidative stress in cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 496–509 (2015).
299. Adomako-Bonsu, A. G., Chan, S. L., Pratten, M. & Fry, J. R. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol. In Vitro* 40, 248–255 (2017).
300. Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 110, 76–82 (2008).
301. Galati, G. & O'Brien, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics:

- Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 287–303 (2004).
302. Lin, Y., Shi, R., Wang, X. & Shen, H.-M. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 8, 634–646 (2008).
 303. He, F. *et al.* Wogonin potentiates cisplatin-induced cancer cell apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Oncol. Rep.* 28, 601–605 (2012).
 304. Hileman, E. O., Liu, J., Albitar, M., Keating, M. J. & Huang, P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: A biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53, 209–219 (2004).
 305. Pelicano, H., Carney, D. & Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* 7, 97–110 (2004).
 306. Swiersz, L. M. Role of endometriosis in cancer and tumor development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 955, 281–292 (2002).
 307. Park, S., Lim, W., Bazer, F. W. & Song, G. Apigenin induces ROS-dependent apoptosis and ER stress in human endometriosis cells. *J. Cell. Physiol.* 233, 3055–3065 (2017).
 308. Einbond, L. S. *et al.* Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia* 83, 1160–1168 (2012).
 309. Zhang, Y., Cao, H., Yu, Z., Peng, H.-Y. & Zhang, C.-J. Curcumin inhibits endometriosis endometrial cells by reducing estradiol production. *Iran. J. Reprod. Med.* 11, 415–422 (2013).
 310. Jung, H. S. *et al.* Antiallergic effects of *Scutellaria baicalensis* on inflammation *in vivo* and *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 141, 345–349 (2012).
 311. Yoou, M. S., Park, C. L., Kim, M. H., Kim, H. M. & Jeong, H. J. Inhibition of MDM2 expression by rosmarinic acid in TSLP-stimulated mast cell. *Eur. J. Pharmacol.* 771, 191–198 (2016).