

1. INTRODUÇÃO

1- ENDOMETRIOSE

1.1- Conceito, clínica, epidemiologia, etiopatogenia

A endometriose é uma condição ginecológica que atinge mulheres em idade reprodutiva e pode ser causa de dor e infertilidade (1). Endometriose é definida como a presença de glândulas e estroma endometrial viáveis fora da cavidade uterina. A doença acomete principalmente o peritônio da pelve, mas pode ocorrer também nos ovários, no septo reto-vaginal e em outros locais (1,2). Estima-se que 6% a 10% das mulheres em idade reprodutiva tenham endometriose. Entre as mulheres com infertilidade, a prevalência de endometriose pode atingir até 40% (3).

A manifestação clínica mais comum da endometriose é a presença de dismenorréia e dispareunia de caráter progressivo (1,4). Não existe clara correlação entre a intensidade dos sintomas e o grau de acometimento pélvico e/ou do estadiamento da doença (5). A infertilidade também é uma manifestação comum da endometriose e parece estar relacionada com o comprometimento da anatomia pélvica (pela presença de aderências e alterações estruturais da pelve), com a disfunção tubária, menor qualidade oocitária e menor receptividade endometrial observadas em algumas pacientes com endometriose (5,6).

Existem várias teorias que tentam explicar a patogênese da endometriose: a metaplasia celômica, a persistência de células embrionárias, a disseminação hematogênica e linfática e o transplante de tecido endometrial (2,3,7-9). A teoria de Sampson propõe que o fluxo menstrual retrógrado de tecido endometrial pelas trompas uterinas para dentro da cavidade peritoneal seria o fator causal da doença. Sampson introduziu o termo “endometriose” e descreveu sua teoria em 1927,

permanecendo ainda hoje como a mais aceita para explicar a doença (3). De acordo com essa teoria, as células descamadas do endométrio menstrual devem apresentar capacidade de adesão, migração e invasão para que a lesão endometriótica seja estabelecida (10,11). Entretanto, o fluxo menstrual retrógrado é encontrado em cerca de 90% das mulheres e a prevalência da endometriose é de 6% a 10% em mulheres em idade reprodutiva (3). Atualmente acredita-se que mecanismos propostos por cada uma das teorias citadas anteriormente possam estar envolvidos no surgimento de diferentes tipos de lesão endometriótica (1-3).

A patogênese da endometriose é multifatorial e envolve alterações funcionais do endométrio uterino, do peritônio e do sistema imune (1-5,12) (Figura 1). As células endometriais, uma vez na cavidade peritoneal, evocam resposta inflamatória acompanhada de angiogênese, aderências e invasão peritoneal (1,2,13). A inflamação é processo complexo regulado por citocinas e fatores de crescimento (14) sendo determinante na patogênese da endometriose (1,2). Os implantes endometrióticos secretam fatores pró-angiogênicos que estimulam a neovascularização contribuindo para a sua sobrevivência na superfície peritoneal (15).

A endometriose é condição ginecológica benigna dependente dos hormônios sexuais. Pacientes com endometriose apresentam expressão aberrante dos receptores de estrogênio/progesterona e/ou das enzimas envolvidas no seu metabolismo. Além disso, a expressão de fatores de crescimento e enzimas que interferem na matriz extracelular também está alterada no endométrio eutópico de pacientes com endometriose (16-21). Como tal condição clínica é dependente de estrogênio, alterações na produção e na ação dos esteróides sexuais têm grande

importância na sua etiopatogênese. Pacientes com endometriose apresentam diminuição de receptores de progesterona do tipo B (ativador dos genes-alvo da progesterona) levando à resistência à ação desse hormônio no endométrio dessas mulheres (21). Células endometrióticas e do endométrio de mulheres com endometriose expressam aromatase, enzima envolvida na síntese de estradiol, criando um ambiente mais estrogênico (17).

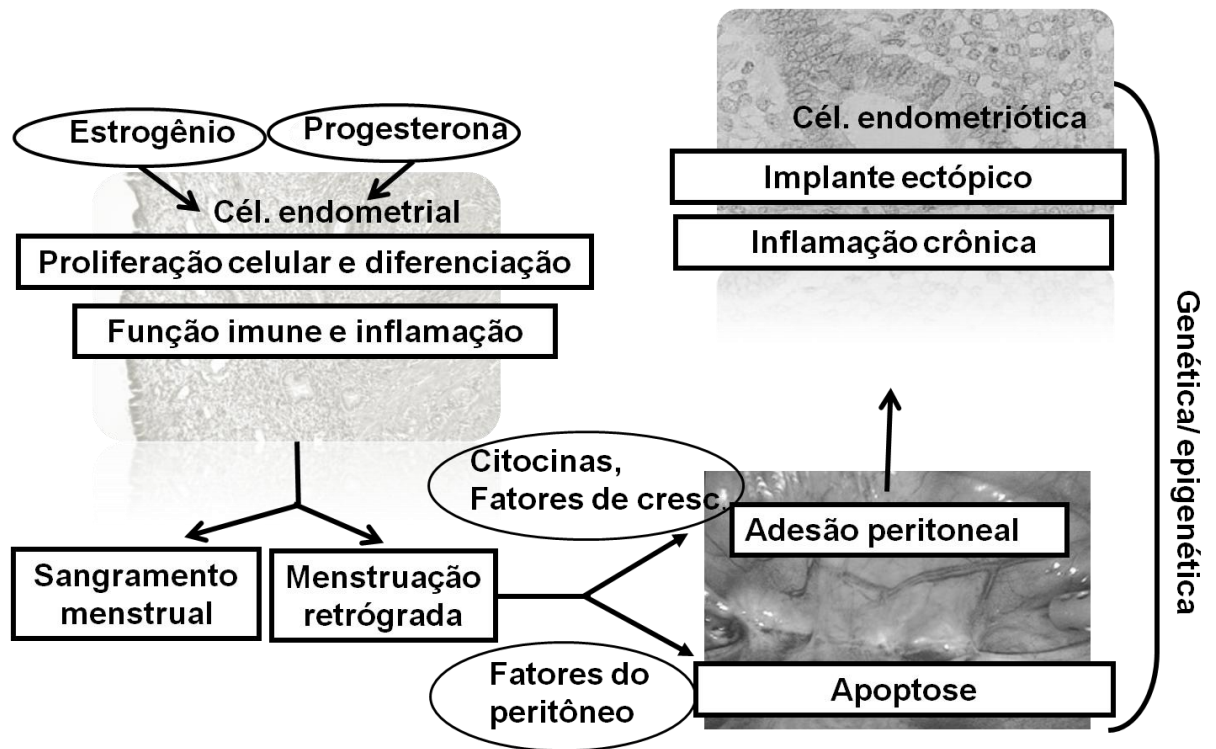
Fatores genéticos parecem estar envolvidos na patogênese da endometriose. Em gêmeas monozigóticas há concordância da prevalência e desenvolvimento da endometriose. A prevalência da endometriose é seis vezes maior em parentes de primeiro grau de mulheres afetadas do que na população em geral (22-27).

A resposta imune do organismo da mulher parece estar envolvida na patogênese da endometriose, e falhas de vigilância imunológica adequada no peritônio podem contribuir para o desenvolvimento do distúrbio (28). Há evidência da ativação de macrófagos da cavidade peritoneal com maior produção de citocinas em mulheres com endometriose, embora haja diminuição da atividade fagocítica (28,29). Nas mulheres com endometriose, há altas concentrações de algumas citocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos no líquido peritoneal (30-33) derivados das próprias lesões, produtos de secreção dos macrófagos e outras células do sistema imunológico. Uma vez que as lesões de endometriose são formadas, secretam diversas moléculas pró-inflamatórias. Nas mulheres com endometriose existe alteração na resposta humoral devido às alterações nos linfócitos B e na produção de citocinas (34). Nestas pacientes, há elevação nas concentrações peritoneais das interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e fator de crescimento tumoral (TNF- α) (32,33). Além disso, há uma diminuição da

citotoxicidade mediada por linfócitos T e diminuição da atividade das células *natural killer* no líquido peritoneal (30,35). Citocinas (interleucinas 1 e 8, fator de necrose tumoral α e interferon γ) atuam sobre os fatores quimiotáticos, que por sua vez recrutam macrófagos e linfócitos T para o peritônio. Estas células imunes modulam a reação inflamatória associada à endometriose.

A etiologia e a patogenia da endometriose permanecem incertas. Importantes avanços foram feitos nos últimos anos com o objetivo de desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas para diminuir os sintomas e melhorar a fertilidade e a qualidade de vida destas pacientes. Após a implantação no peritônio, as células endometriais dependem da proliferação e vascularização para sua sobrevivência. Na patogênese da endometriose a existência de diferenças na capacidade de adesão, invasão e sobrevivência dos implantes endometrióticos podem ser determinantes para o desenvolvimento da doença. Estudos sobre o papel da genética, do meio ambiente, do sistema imunológico, e do estradiol na patogênese da endometriose, bem como estudo pós-genômico de anormalidades intrínsecas no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose podem fornecer mais pistas sobre a fisiopatologia da dor e da infertilidade (3).

Figura 1: Patogênese da endometriose



1.2 Diagnóstico

Apesar do diagnóstico definitivo da endometriose ser cirúrgico, através do estudo anátomo-patológico das lesões (1,36), a suspeita e o diagnóstico clínico são importantes para a definição da doença e para o tratamento adequado e precoce da paciente. O tempo médio entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico da paciente pode ser até de sete anos (37).

Na presença do quadro clínico clássico da endometriose, ou seja, mulheres na fase reprodutiva apresentando dor pélvica progressiva, infertilidade, dispareunia e presença de massa pélvica, de forma isolada ou em associações, é recomendável a investigação da endometriose (1,2,4,5,12,36,38,39). O diagnóstico clínico de certeza é difícil.

A presença de endometriose pélvica deve sempre ser investigada nas mulheres na menacme com dor pélvica que tenham como característica relevante o agravamento da dor na fase próxima à menstruação. Se a este sintoma se associarem infertilidade, o achado de nódulos no fundo de saco vaginal ou massa pélvica ao exame físico, o diagnóstico clínico está bem fundamentado, e o passo seguinte é realizar a propedêutica complementar (5,12,36).

O diagnóstico clínico da endometriose baseia-se então nos sinais e sintomas da doença, exames complementares (ultrassonografia transvaginal, ressonância nuclear magnética, tomografia computadorizada, etc) e nos marcadores sorológicos existentes. Contudo, o diagnóstico definitivo de endometriose permanece ainda invasivo, necessitando que a paciente seja submetida à videolaparoscopia para confirmação com exame anátomo-patológico (2,32,40). A necessidade de métodos diagnósticos invasivos como laparoscopia e biópsia permanece um fator de limitação para o diagnóstico correto e oportuno da endometriose. Marcadores bioquímicos precisos e confiáveis trariam um grande avanço nessa área, mas na prática o marcador ideal ainda não existe (12,41).

A ultrassonografia transvaginal e a dosagem de CA125 são os métodos não-invasivos comumente utilizados para o diagnóstico de endometriose e endometrioma, mas esses métodos não atingem sensibilidade e especificidade ótimas para todas as formas clínicas e estágios da doença.

O CA-125 é o marcador sorológico atualmente mais utilizado no diagnóstico da doença. Trata-se de um antígeno da superfície celular que é expresso nos tecidos derivados do epitélio celômico como endométrio, endocérvice, tubas

uterinas, peritônio, pleura e pericárdio (42,43). Em mulheres com endometriose, observam-se concentrações séricas aumentadas (acima de 35 UI/ml) de CA-125 nas formas moderada e grave (estágios III e IV), em especial na presença de aderências extensas e/ou endometrioma. Esse aumento, todavia, não é significativo na endometriose peritoneal mínima ou leve e está ausente em muitos casos de endometriose profunda infiltrativa (44). O CA-125 apresenta baixo valor preditivo negativo, portanto valores normais não exclui a presença de endometriose (44,45) . Por outro lado, o encontro de níveis elevados de CA-125 pode ser sugestivo, mas não indicativo de endometriose devido às diversas condições fisiológicas e patológicas que podem ser responsáveis por esse aumento, como por exemplo, outros cistos benignos de ovário (46).O CA-125 apresenta boa especificidade mas baixa sensibilidade, limitando seu uso no diagnóstico. Mesmo assim, ainda é o marcador sorológico mais utilizado no diagnóstico e, principalmente, no acompanhamento do tratamento das pacientes (12,45).

Alguns possíveis marcadores bioquímicos séricos, como citocinas, hormônios e fatores de crescimento têm sido investigados como parte da abordagem diagnóstica da endometriose. O tecido endometrial poderia liberar níveis circulantes de tais substâncias que estariam aumentadas na corrente sanguínea. A resposta inflamatória associada com a doença poderia fornecer outros marcadores bioquímicos. Esses marcadores de diagnóstico são necessários especialmente para formas mínimas e leves de endometriose, que não são avaliáveis ao exame físico ou das técnicas de imagem, e não justificam a abordagem cirúrgica (47,48).

Estudos recentes têm apontado possíveis novos marcadores para o diagnóstico não invasivo de endometriose (49-53). Várias substâncias foram

testadas mas o resultado é, na maioria das vezes, frustrante (51). Interleucina 6 e CA 19-9 não acrescentam precisão diagnóstica ao CA-125 e têm desempenho medíocre como testes isolados (50). Proteína C reativa, IgM anticardiolipina e proteína amilóide sérica A estão aumentados na endometriose grave (49), mas não parecem atingir níveis satisfatórios de sensibilidade e especificidade. Dois estudos de coorte realizados na Università di Siena sugeriram que urocortina (52) e folistatina (12) apresentariam boa sensibilidade no diagnóstico de endometriose grave (estágios III e IV) com a presença de endometrioma ovariano. Esses estudos necessitam de validação em outros centros e em coortes mistas, de forma que se possa aferir o desempenho diagnóstico dos novos marcadores em outras formas de endometriose e em uma população mais ampla.

Assim como os marcadores séricos, novas estratégias estão sendo estudadas para o diagnóstico não-invasivo da endometriose. A mulher com endometriose poderia manifestar alterações moleculares que poderiam apresentar-se em tecidos mais acessíveis do que a própria lesão e mais específicos do que o soro ou plasma. Por exemplo, a análise de leucócitos do sangue periférico, uma técnica ainda incipiente, mas promissora (54) e o estudo do endométrio eutópico, que tem mostrado resultados bastantes animadores (55) . As estratégias de diagnóstico não-invasivo deverão evoluir para a detecção simultânea de várias moléculas, preferencialmente sem correlação estreita entre elas, de forma a aumentar a performance do teste e torná-lo útil na prática clínica (41).

2. ATIVINA A, PROTEÍNAS RELACIONADAS À ATIVINA A, FOLISTATINA, ENDOMÉTRIO E ENDOMETRIOSE

2.1 Estrutura e síntese das ativinas e inibinas

As ativinas, inibinas, folistatina, hormônio anti-mulleriano e as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (*Bone Morphogenetic Proteins* – BMPs), são membros da superfamília do Fator de Transformação do Crescimento- β (*Transforming Growth Factor- β* - TGF- β) (56-59). Ativinas e inibinas apresentam ação central na regulação do Hormônio Folículo Estimulante (FSH); são glicoproteínas diméricas resultantes de combinações diferentes das subunidades α e β . Há dois tipos principais de subunidades β (βA e βB) e uma subunidade α . As inibinas A e B são formadas pela junção entre a cadeia α e a cadeia β correspondente (inibina A: $\alpha+\beta A$; inibina B: $\alpha+\beta B$). As ativinas A, AB, e B são formadas por diferentes combinações de duas cadeias β , respectivamente, $\beta A+\beta A$, $\beta A+\beta B$ e $\beta B+\beta B$ (60-62).

Ativinas e inibinas foram identificadas originalmente como fatores que agiam de forma antagônica na hipófise na regulação endócrina da produção do FSH. Estudos mais recentes descreveram a expressão das ativinas e inibina em vários tipos celulares, indicando diferentes funções dessas proteínas, principalmente como moduladoras parácrinas da função reprodutiva, incluindo a função ovariana e a tumorigênese gonadal (62).

Além disso, os membros da superfamília do TGF- β são expressos no endométrio humano e apresentam ações importantes na proliferação celular, diferenciação celular, função imune, regulação da apoptose e remodelamento dos

tecidos, apresentando, por conseguinte, papel importante no ciclo menstrual, decidualização do endométrio e no início da gestação (59,62,63).

A ativina A ($\beta A + \beta A$) é produzida no endométrio (64,65) e, sob a modulação da progesterona e IL-1 (66), apresenta maior expressão de mRNA na fase secretora do ciclo menstrual (67), participando, possivelmente, do processo de decidualização endometrial (68,69).

A ativina B ($\beta B + \beta B$) também é expressa pelo endométrio (65) e está relacionada com o grau de decidualização endometrial e sua expressão está diminuída na gravidez tubária (70).

2.2 Mecanismo de sinalização da ativina e o antagonismo da inibina

Os efeitos biológicos das ativinas são mediados por receptores específicos (ActR), codificados por diferentes genes – ActRI e ActRII (62,71,72). As células-alvo da ativina precisam expressar ambos os receptores da ativina para responder aos sinais dessa proteína (62,72). A ativina se liga a esses receptores transmembrana de maneira seqüencial desencadeando uma cascata de fosforilação protéica intracelular. Em humanos existem dois *Activin Receptor Type II* (ActRII), chamados de ActRIIA e ActRIIB, e dois *Activin Receptor Type I* (ActRI), chamados ActRIA ou ALK2 e ActRIB ou ALK-4. Primeiro, a ativina se liga a um dos receptores tipo II (ActRIIA ou ActRIIB) e essa ligação faz o recrutamento e ativação do *Activin Receptor Type I* (ActRI, principalmente o ActRIB) (73). A ativação do ActRI inicia a fosforilação de uma molécula de transdução da família *Smad* (*Smad 2* ou *Smad 3*),

que então interage com a *Smad* 4. Este complexo se desloca para o núcleo celular para promover a expressão gênica. O complexo ativado de *Smads* promove a transcrição gênica ou ligando-se diretamente no DNA ou requerendo um co-fator para essa ligação como, por exemplo, o *FAST (Forkhead Activin Signalling Transducer)* (74,75). (Figura 2)

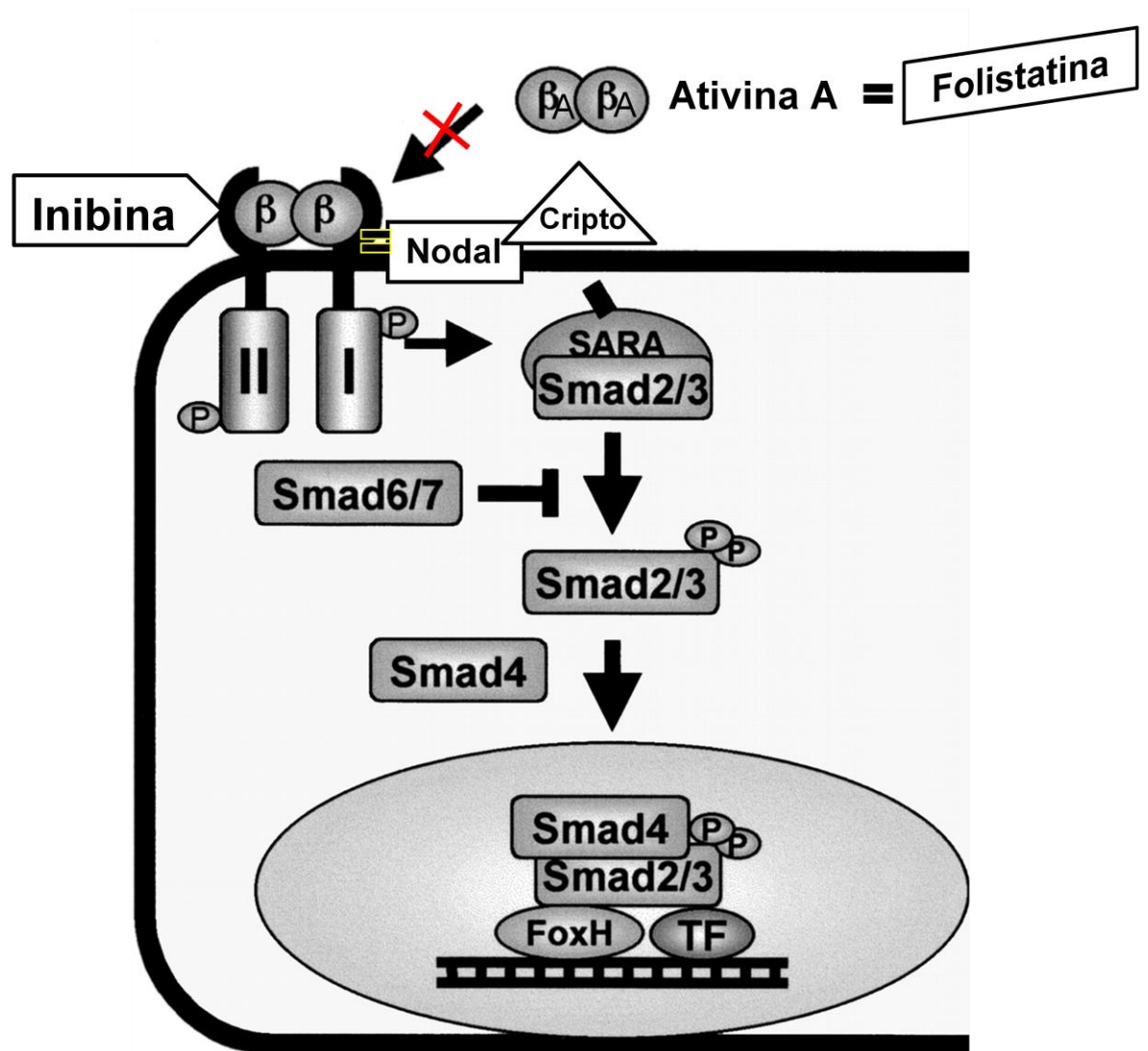
A família *Smad* é um conjunto de moléculas responsáveis pela sinalização intracelular da ativina e de outros membros da família do TGF- β (74).

Para o funcionamento desse mecanismo de ação das ativinas é necessário a presença dos dois tipos de receptores funcionando em sequência para transmitir os sinais das ativinas para dentro das células.

Nodal e cripto são moduladores dos receptores da ativina. Nodal é um membro da família do TGF- β que requer a presença de um co-receptor, o cripto, para se ligar ao receptor da ativina (62,76). O nodal inibe os processos de formação e diferenciação que ocorrem no desenvolvimento embrionário inicial (77) e a atividade de sua cascata de ação está aumentada em vários cânceres humanos (78). O cripto é uma glicoproteína de membrana celular que funciona como co-receptor da ativina através da formação de um complexo com os receptores da ativina, antagonizando seus efeitos (79). O cripto participa da proliferação, migração, invasão e angiogênese na progressão de tumores (80,81).

A maioria das ações biológicas das inibinas ocorre através do antagonismo das ativinas e de outras proteínas da família do TGF- β (62,75). As inibinas antagonizam as ações das ativinas através de uma ligação competitiva com os receptores tipo II da ativina, nodal e cripto (62,75,76,79).

Figura 2: Mecanismo de sinalização da ativina



Adaptado de :Risbridger G P et al. *Endocrine Reviews* 2001;22:836-858

2.3 Folistatina

A folistatina é um polipeptídeo monomérico rico em cisteína, que atua como proteína ligadora da ativina. A folistatina se liga à ativina com alta afinidade impedindo sua interação com os ActRII, agindo assim, como um regulador da bioatividade da ativina (82). A folistatina também se liga e modula as ações de vários outros membros da família do TGF- β como as miostatinas e algumas *bone*

morphogenetic proteins (BMP) (82,83). Apresenta ação endócrina de inibição da síntese e secreção do FSH e da resposta do FSH ao GnRH.

Existem três isoformas de folistatina: FS-315 e FS-288, geradas por diferenças no processamento pós-transcricional, e FS-303, gerada por clivagem proteolítica a partir da FS-315. A principal forma circulante é a FS-315 que, por ser a forma longa, não se liga aos proteoglicanos de membrana. A isoforma FS-288 se liga aos proteoglicanos de membrana e parece ter um papel importante na regulação das ações da ativina, por internalização e degradação do complexo folistatina-ativina. A folistatina apresenta maior afinidade pela ativina A (62,75,84).

2.4 Ativina A, proteínas relacionadas à ativina A, folistatina, endométrio e endometriose

A ativina A é produzida pelo endométrio de mulheres com e sem endometriose (64,65,85,86). Além disso, ativina A é produzida pelas células endometrióticas (84,86). No endométrio, a ativina A parece estar envolvida com a decidualização e o início da gestação (22,23). Sua expressão é variável durante o ciclo menstrual, sendo maior na fase secretora em mulheres saudáveis (67). Alguns autores consideram a maior expressão de ativina A na fase secretora do ciclo menstrual como um sinal de receptividade endometrial ao embrião, promovendo a invasão trofoblástica durante a implantação embrionária (66,67). Além disso, ativina A pode estar envolvida com a patogênese da endometriose uma vez que essa glicoproteína está relacionada com a angiogênese (87), aumento da atividade das MMPs (88) e com a infiltração de macrófagos na membrana basal nos estados inflamatórios (89). Um estudo recente demonstrou que a ativina A promoveu um

aumento significativo das taxas de invasão peritoneal por células endometriais epiteliais e estromais *in vitro*, podendo influenciar na gênese da lesão endometriótica (75).

Nodal e cripto, moléculas moduladoras do receptor da ativina, são expressos no endométrio humano e a expressão do cripto em células endometriais estromais e epiteliais é mais alta durante a fase proliferativa do ciclo menstrual. Além disso, a expressão do cripto está aumentada no adenocarcinoma de endométrio (81).

A inibina α foi primariamente detectada no lúmen das células glandulares e nas células epiteliais do endométrio humano e sua expressão apresentou um aumento na fase secretora do ciclo menstrual (90). A expressão da inibina α também é exacerbada nas células estromais decidualizadas, na fase secretora e após a administração de progestógenos exógenos, sugerindo sua regulação pela progesterona e seu papel na implantação embrionária em humanos (65,91).

A expressão de folistatina (mRNA e proteína) está aumentada em implantes endometrióticos do ovário em comparação com endométrio normal (92). Em pacientes com endometrioma, a concentração da folistatina é maior no conteúdo cístico do que no líquido peritoneal e no plasma, o que sugere a secreção local de folistatina pelas células endometrióticas (53). O papel da folistatina na patogênese da endometriose ainda é incerto. A folistatina tem ação antagônica à ativina A, inibindo a decidualização das células estromais *in vitro* (68) e diminuindo a capacidade de invasão de tecidos adjacentes por células endometriais cultivadas *in vitro* (75). Assim, a folistatina poderia estar envolvida na patogênese da endometriose por participar da diferenciação endometrial, invasão peritoneal, modulação do sistema imune e angiogênese. Como a maioria das ações da

folistatina resulta de sua ação bloqueadora da ativina, é importante caracterizar, nos mesmos tecidos e células, a expressão dos receptores e co-receptores de ativina, como o ActRII, nodal e cripto (93).

Recentemente, foi observado que a folistatina, quando comparada ao CA125, apresenta maior sensibilidade e especificidade na detecção do endometrioma (53). A folistatina poderia ser um bom marcador para o diagnóstico de endometriose ovariana, uma vez que o hormônio pode ser medido no soro facilmente, não requer métodos radioativos ou procedimentos complicados para sua medida, há kits ELISA disponíveis comercialmente e os resultados são reprodutíveis. Além disso, os níveis de folistatina não se alteram durante o ciclo menstrual (94), não apresentam variação durante o dia (95) e não se alteram na menopausa (94,96).

As evidências de que os tecidos endometrióticos expressam ativina A (85), o receptor ActRII, nodal, cripto (86) e folistatina (92) e de que a ativina A aumenta a capacidade de invasão das células endometriais *in vitro* sugerem que estas moléculas participem do desenvolvimento e manutenção dos implantes na endometriose (75).

2. OBJETIVOS

1- OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão local e sistêmica da ativina A e da folistatina e seus efeitos biológicos *in vitro* na endometriose.

2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de folistatina, da subunidade beta-A da ativina/inibina (ativina A) e das proteínas relacionadas à ativina A, durante as fases do ciclo menstrual, no endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose e em lesões endometrióticas;

- Verificar se as concentrações séricas de ativina A e folistatina diferem entre as várias formas de endometriose e se essas proteínas podem ser utilizadas como marcadores de endometriose;

- Investigar os efeitos da ativina A e da folistatina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores de angiogênese em cultura *in vitro* de células derivadas de endométrio de mulheres com e sem endometriose.

3. MATERIAS E MÉTODOS

1. PACIENTES E MÉTODOS

Experimento 1: Expressão de ativina A, proteínas relacionadas à ativina A e folistatina no endométrio e endometriose.

Foram incluídas no estudo 48 mulheres com endometriomas confirmados por videolaparoscopia e um grupo controle formado por 48 mulheres pareadas por idade, com história de ciclos menstruais regulares e submetidas à esterilização tubária por via laparoscópica. Nos dois grupos as amostras de endométrio da fase proliferativa foram separadas em fase proliferativa inicial (dias 5-10) e proliferativa tardia (dias 11-14). As amostras colhidas na fase secretora foram divididas em fase secretora inicial (dias 14-22) e secretora tardia (dia 23 em diante) (Tabela 1).

Aproximadamente 1cm³ de tecido endometrial foi obtido de mulheres com ciclos menstruais regulares (28-30 dias). O endométrio eutópico foi colhido por histeroscopia e todas as amostras foram classificadas de acordo com o último dia da menstruação e confirmadas pela avaliação ultrassonográfica. A datação do endométrio foi confirmada histologicamente pelos critérios de Noyes (97).

Nas pacientes com endometriose, uma amostra de tecido endometriótico foi colhida dos endometriomas ovarianos durante a intervenção cirúrgica. Os tecidos endometriais foram cuidadosamente dissecados da parede do cisto, não colhendo junto material do córtex ovariano normal e foram confirmados pelo exame anatomopatológico. O diâmetro do cisto endometriótico medido pela ultrassonografia transvaginal foi de 38 a 72 mm e todas as pacientes incluídas no estudo apresentavam endometriose nos estágios III ou IV da doença, de acordo com a classificação da Associação Americana de Medicina Reprodutiva.

Todas as pacientes estavam em tratamento para engravidar no centro de infertilidade da Università di Siena. Outras doenças endócrinas, uterinas e fator masculino de infertilidade foram excluídos. Todas as pacientes foram submetidas à anamnese e exame físico completos. Pacientes em uso de hormonioterapia nos últimos três meses foram excluídas do estudo.

Todas as amostras foram imediatamente submersas em nitrogênio líquido para permitir a extração do RNA e a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Tabela 1- Características dos dois grupos, mulheres com e sem endometriose, nas diferentes fases do ciclo menstrual

Características	Controle				Endometriose				Total
	EP	LP	ES	LS	EP	LP	ES	LS	
Pacientes, n	10.0	14.0	11.0	13.0	11.0	13.0	10.0	14.0	96.0
Idade média, anos	28.6	29.0	30.6	29.6	32.3	30.0	28.0	33.6	30.2
Desvio-padrão	(5.6)	(5.8)	(6.4)	(5.9)	(4.3)	(4.0)	(6.5)	(4.0)	(5.3)

Legenda: EP = early proliferative (proliferativa inicial); LP = late proliferative (proliferativa tardia); ES = early secretory (secretora inicial); LS = late secretory (secretora tardia).

Extração de RNA e preparação do cDNA

O tecido foi triturado e homogeneizado. O RNA total foi extraído usando um kit comercial, RNeasy Protect Mini Kit e então tratado com água sem ribonucleases-RNAase (RNase-free) de acordo com as instruções do kit (RNase Protect Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany). O RNA foi quantificado através da absorção ultravioleta (OD260/OD280) e 300µg foram utilizados para fazer a retrotranscrição, utilizando o

kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Reação em Cadeia da Polimerase (Real Time-PCR)

As expressões dos mRNAs da ativina A, ativina B, receptores da ativina, moduladores dos receptores da ativina e antagonistas da ativina no endométrio eutópico e ectópico foram comparadas usando a *Real Time-PCR*. A RT-PCR foi realizada usando o Opticon 2 thermal cycler (MJ Research, Bio-Rad Laboratories, Waltham, MA) e as seguintes sondas de expressão gênica TaqMan (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany):

Tabela 2- Conjunto de sondas de expressão gênicas usadas na *Real Time-PCR*

Sonda de expressão gênica	Código do produto
18s-RNA ribossomal (housekeeping	Hs03003631_m1
Ativina A	Hs00170103_m1
Ativina B	Hs00173582_m1
ActR11	Hs00155658_m1
Cripto	Hs00414425_m1
Nodal	Hs00415443_m1
Inibina α	Hs00171410_m1
Folistatina	Hs00246260_m1

O housekeeping gene utilizado como controle interno foi o 18s- RNA ribossomal. Todas as amostras foram feitas em triplicada na placa de PCR com 96 poços (Applied Biosystems), com a utilização da solução TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), indicada no protocolo de PCR da empresa fornecedora das sondas.

As curvas padrão relativas foram feitas utilizando-se uma “amostra padrão” de cDNA preparada a partir de uma biópsia de endométrio secretor. A amostra padrão foi diluída de forma seriada e usada para construção das curvas padrão utilizadas para quantificar os resultados da *Real Time*-PCR. O número de ciclos do ponto inicial da curva necessários para a amplificação do DNA alvo foi utilizado para calcular o valor de entrada de cada amostra através da equação linear gerada pela curva padrão. Os resultados foram obtidos através de uma razão entre o gene estudado e o housekeeping, 18s (98). O protocolo de amplificação utilizado foi o seguinte:

- (1) desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C
- (2) 45 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95°C)
- (3) Pareamento dos primers e alongamento por 1 hora a 60°C

Em todas as placas de *Real Time*-PCR foi utilizado uma amostra sem a enzima transcriptase reversa como um controle negativo (ausência de amplificação), também em triplicata.

Experimento 2: Avaliação dos níveis séricos de ativina A e folistatina em portadoras de endometriose.

As pacientes foram recrutadas prospectivamente para o estudo entre março de 2008 e maio de 2010 no Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte e no Policlinico Le Scotte, Università di Siena, em Siena, Itália. Além destas, avaliamos retrospectivamente casos dos bancos de amostras biológicas dos centros de estudos de endometriose de São Paulo (USP) e da Università di Milano, Itália.

O grupo controle (n=75) foi constituído por pacientes com ciclos menstruais regulares com ovulação documentada e que se submeteram à cirurgia videolaparoscópica para salpingotripsia ou à cirurgia intrauterina (devido a mioma submucoso, pólico ou septo) ou que foram encaminhadas ao centro de infertilidade devido fator masculino. As pacientes apresentavam exame pélvico e ultrassonografia transvaginal normais e não faziam uso de hormonioterapia há pelo menos 3 meses.

Foram avaliadas 139 pacientes com endometriose divididas em três grupos: endometriose peritoneal (n=28), definida pela presença de apenas focos superficiais de endometriose no peritônio; endometrioma ovariano (n=61), definido pela presença de pelo menos um cisto ovariano rodeado por tecido endometriótico; e endometriose infiltrativa (n=50), definida pela presença de lesões em quatro regiões: (i) bexiga, quando as lesões infiltram a muscular própria do órgão; (ii) ligamento uterosacro; (iii) vagina, quando as lesões infiltram a porção anterior do septo retovaginal, fórnix posterior da vagina e área retroperitoneal entre o septo

retovaginal anterior e o fórnix posterior da vagina; (iv) intestino, quando as lesões acometem a muscular própria do intestino.

Amostras de sangue periférico

Todas as amostras de sangue, tanto as prospectivas quanto as provenientes de banco de amostras biológicas, foram coletadas de veia periférica imediatamente antes da indução anestésica. O sangue foi centrifugado a 400x g por 10 minutos na temperatura ambiente e o soro foi separado com a pipeta e transferido para um tubo criorresistente e estocado à -80°C.

Dosagens de ativina A e folistatina

As concentrações de ativina A e folistatina foram medidas usando Kits de ensaio imunoenzimático disponível comercialmente (R&D Systems, USA). Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Resumidamente, o diluente (100 µl), amostras e standards (100 µl) foram adicionados à placa de 96 poços revestida com o anticorpo primário (IgG anti-ativina A ou anti-folistatina). A placa foi então incubada por 3 horas na temperatura ambiente (ativina A) ou à 4°C (folistatina), a seguir, a placa foi lavada com tampão, secada com papel-toalha e incubada com o segundo anticorpo por 1 hora a temperatura ambiente (ativina A) ou por 2 horas a 4°C (folistatina). A placa de ensaio foi rigorosamente aspirada, lavada por 5 vezes com detergente não-iônico diluído em salina tamponada (solução de lavagem, integrante do kit) e invertida sobre material absorvente até a secagem completa. O cromógeno tetrametilbenzidina (TMD) (100 µl) foi adicionado e incubado por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,2 M (100 µl) assim que o poço de referência (padrão zero) começou a apresentar cor visível. A placa foi

submetida a leitura de absorbância a 450 nm em um leitor de ELISA modelo EL-340 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

O kit para dosagem de ativina A utiliza um par de anticorpos monoclonais anti-ativina A humana. O kit apresenta um limite de detecção de 4pg/mL com um limiar de detecção variando de 15 a 1000pg/mL. Não apresenta reatividade cruzada com outros membros da família do TGF- β . Os coeficientes de variação máximos intra- e inter-ensaio são de 4,4% e 7,9%, respectivamente.

O kit para dosagem da folistatina utiliza um par de anticorpos monoclonais anti-FS300 humana, mas detecta tanto a FS288 quanto a FS315 com 95% de recuperação, entretanto, quando utilizado em amostras de sangue periférico, reflete essencialmente a dosagem da FS315 porque esta isoforma corresponde a >90% da folistatina na circulação (90). O ensaio detecta a folistatina sérica total (livre + conjugada) e apresenta um limite de detecção de 29pg/mL com um limiar de detecção variando de 250 a 16.000pg/mL. Não apresenta reatividade cruzada com outros membros da família do TGF- β ou com α 2-macroglobulina. Os coeficientes de variação máximos intra- e inter-ensaio são de 2,7% e 9,2%, respectivamente.

Experimento 3: Efeitos da ativina A e da folistatina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores de angiogênese em cultura *in vitro* de células derivadas de endométrio de mulheres com e sem endometriose.

O grupo de estudo incluiu pacientes não gestantes com endometriose (faixa etária entre 25 e 33 anos) (n = 6) submetidas à excisão laparoscópica de endometrioma (diâmetro do cisto entre 39-74 mm). Todas as pacientes com endometriose incluídas no estudo apresentavam endometriose nos estágios III ou IV, de acordo com a classificação da Associação Americana de Medicina Reprodutiva. O grupo controle foi representado por mulheres saudáveis, não gestantes (n = 6) (faixa etária entre 23 e 36 anos), submetidas à videolaparoscopia devido cisto ovariano benigno ou miomas. Todas as mulheres apresentavam ciclo menstrual regular (28-30 dias), e as amostras de endométrio foram classificadas como fase proliferativa de acordo com o data da última menstruação confirmado por ultra-sonografia e pelos critérios histológicos (97). As características dos indivíduos estão na Tabela 3. Mulheres com distúrbios endócrinos ou distúrbios clínica outros foram excluídos. Indivíduos que tinham recebido tratamento com esteróides durante os últimos três meses foram excluídos.

Culturas endometriais

Amostras de endométrio foram obtidas por biópsia aspirativa realizada sob anestesia imediatamente antes da laparoscopia. As células endometriais estromais humanas (em inglês, *human endometrial stromal cells*- HESC) foram isoladas imediatamente após a coleta como previamente descrito (93). Resumidamente, o material foi transportado ao laboratório em meio de cultura de Eagle modificado por

Dulbecco (Invitrogen, Italy) acrescido de soro bovino fetal 10% (Sigma, Italy). As amostras foram fracionadas com bisturi e incubadas com colagenase tipo 1 a 0,1% por 1 ou 2 horas a 37°C em banho com agitação. O material foi então centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm à temperatura ambiente, o pellet resuspenso em meio DMEM/F12 (Invitrogen, Italy) acrescido de soro bovino fetal 10% (Sigma, Italy) e antibióticos (Invitrogen, Italy) e cultivado à 37°C na incubadora com 95% de ar e 5% de CO₂. Após a sedimentação das células epiteliais, as células estromais foram recolhidas com o sobrenadante e transferidas para frascos de cultura, onde as células aderentes ao frasco foram cultivadas em monocamada.

Após a terceira passagem, quando atingiram a subconfluência, as células foram incubadas em meio DMEM/F12 com soro inativado (charcoal-stripped) e tratadas durante 24h com concentrações seriadas (12,5 ng/mL, 25 ng/mL e 50 ng/mL) de ativina A; a concentração de 25 ng/mL foi utilizada para o tratamento com ou sem a adição de folistatina (250ng/mL).

Tabela 3- Características das amostras para HESC

Características							
Amostra	Diagnóstico	Fase do ciclo	Periodicidade ciclo/ dia da laparoscopia	Idade, anos	Uso de drogas* (últimos 3 meses)	Ca125 U/ml	IMC
1	Controle (CO)	Proliferativa	28/07	30	Não	9.3	25.2
2	Endometrioma	Proliferativa	28/08	33	Não	15.8	23.4
3	Controle (CO)	Proliferativa	29/09	34	Não	15.9	22.6
4	Controle (M)	Proliferativa	30/10	23	Não	17.5	19.2
5	Endometrioma	Proliferativa	28/08	27	Não	36.5	25.4
6	Endometrioma	Proliferativa	28/09	29	Não	80.5	18.8
7	Endometrioma	Proliferativa	29/10	32	Não	178.9	24.0
8	Endometrioma	Proliferativa	29/07	32	Não	105.9	22.6
9	Controle (CO)	Proliferativa	30/06	34	Não	21.1	21.5
10	Controle (CO)	Proliferativa	30/10	36	Não	10.3	19.3
11	Endometrioma	Proliferativa	28/07	25	Não	12.8	26.2
12	Controle (CO)	Proliferativa	29/07	26	Não	12.4	18.4

Nota: Controle - sem endometriose/ CO-cisto ovariano; M- Mioma; IMC- Índice de Massa Corporal (Kg/m²)/*contraceptivo hormonal, drogas hormonais, anti-inflamatórios não esteroidas, corticosteróides.

Dosagens de IL-6, IL-8 e VEGF no meio de cultura

O meio de cultura foi coletado para análise das concentrações de interleucinas 6 e 8, e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Para a quantificação destes fatores foram utilizados kits de ensaio imunoenzimático produzidos pelas companhias Abcam e Cayman (Itália).

Tabela 4- Conjunto de ensaios enzimáticos usados para realização de ELISA

Ensaio imunoenzimático	Empresa/Código do produto
IL-6	Abcam (Itália)/ab46027
IL-8	Abcam (Itália)/ab46032
VEGF	Abcam (Itália)/ab100662

As concentrações dessas interleucinas e de VEGF nos meios de cultura foram dosadas e analisadas de acordo com as instruções do fabricante: interleucina (IL) -6 (limiar de detecção: 6,25-200 pg / mL), interleucina (IL) -8 (limiar de detecção: 62,5-2000 pg / mL) e VEGF (limiar de detecção: 58,23-6000 pg / mL).

Resumidamente, as amostras (100 µl), o diluente e padrões (100 µl) foram adicionados a uma placa de 96 poços revestidos com anticorpos, que foi selada e incubada por 1 h a temperatura ambiente (IL-6, IL-8) ou por 2,5 horas (VEGF). A placa foi então lavada com tampão de lavagem, secada em papel toalha e incubada com o segundo anticorpo por mais 30 minutos (IL-6, IL-8) ou 1 h (VEGF) em temperatura ambiente. Após nova lavagem, o cromógeno tetrametilbenzidina (TMD) (100 µl) foi adicionado por 15 min (IL-6, IL-8) ou 30 min (VEGF) à temperatura ambiente e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N. A placa foi submetida à leitura de absorbância a 450 nm em um leitor de ELISA modelo EL-340 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Os coeficientes de variação máximos intra e inter-ensaio são, respectivamente, 4,2% e 7,7% (IL-6), 4,3% e 7,8% (IL-8), <10% e <12% (VEGF).

Reação em Cadeia da Polimerase (Real Time-PCR)

Findo o período de estímulo e recolhido o meio de cultivo, as células foram coletadas e tiveram o RNA extraído para análise da expressão gênica das citocinas e mediadores de angiogênese, utilizando a técnica de *Real Time-PCR*. As expressões dos mRNAs de IL-6, IL-8 e VEGF-A nas HESCs tratadas foram comparadas usando a *Real Time-PCR*. A *Real Time-PCR* foi realizada usando o Opticon 2 thermal cycler (MJ Research, Bio-Rad Laboratories, Waltham, MA) e as seguintes sondas de expressão gênica TaqMan (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany):

Tabela 5- Conjunto de sondas de expressão gênicas usadas na Real Time-PCR

Sonda de expressão gênica	Código do produto
18s-RNA ribossomal (housekeeping)	Hs03003631_m1
IL-6	Hs00985639_m1
IL-8	Hs00174103_m1
VEGF	Hs00900055_m1

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Kolmorov-Smirnov) para avaliar a natureza da distribuição utilizando o software Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Quando preencheram os critérios para análise paramétrica, foram descritos como média \pm erro padrão da média e as concentrações séricas dos marcadores nos grupos (com e sem endometriose) e nos subgrupos (tipo de lesão) foram comparadas utilizando análise de variância de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os dados que não puderam ser analisados por testes paramétricos foram descritos como mediana e intervalo inter-quartil e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise das diferenças encontradas durante as fases do ciclo menstrual foi realizada usando a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Turkey para comparações múltiplas. Quando dois grupos foram comparados, por exemplo, grupo controle versus mulheres com endometriose, o teste T de Student foi realizado. Os resultados da *Real Time*-PCR foram descritos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

1- Experimento 1- Expressão de ativina A, proteínas relacionadas à ativina A e folistatina no endométrio e endometriose.

1.1- Endométrio eutópico

Ativina A, ativina B, receptor da ativina, nodal, cripto, inibina α e folistatina foram expressos (mRNA) em todas as amostras de endométrio eutópico avaliadas. A análise da expressão gênica foi realizada em todas as fases do ciclo menstrual em mulheres saudáveis e em pacientes com endometriose. Em cada grupo de pacientes (controle e endometriose), a variação da expressão gênica foi avaliada durante o ciclo menstrual. Além disso, cada fase do ciclo menstrual foi comparada entre o grupo controle e o grupo com endometriose.

1.1.1- Ativina A, ativina B e receptor da ativina

A expressão da ativina A (mRNA) em mulheres saudáveis foi maior na fase secretora do que na fase proliferativa ($p < 0,001$). Nas pacientes com endometriose não foi observado mudanças na expressão da ativina A (mRNA) durante as fases do ciclo menstrual (Figura 3A). Em relação às pacientes controles, pacientes com endometriose apresentaram maior expressão da ativina A nas fases proliferativa inicial e tardia ($p < 0,05$). A expressão do mRNA da ativina B não mostrou diferenças estatisticamente significativas durante as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual tanto no grupo controle quanto nas pacientes com endometriose (Figura 3B). Não se demonstrou diferenças na expressão do mRNA do ActRII (Figura 3C).

Figura 3

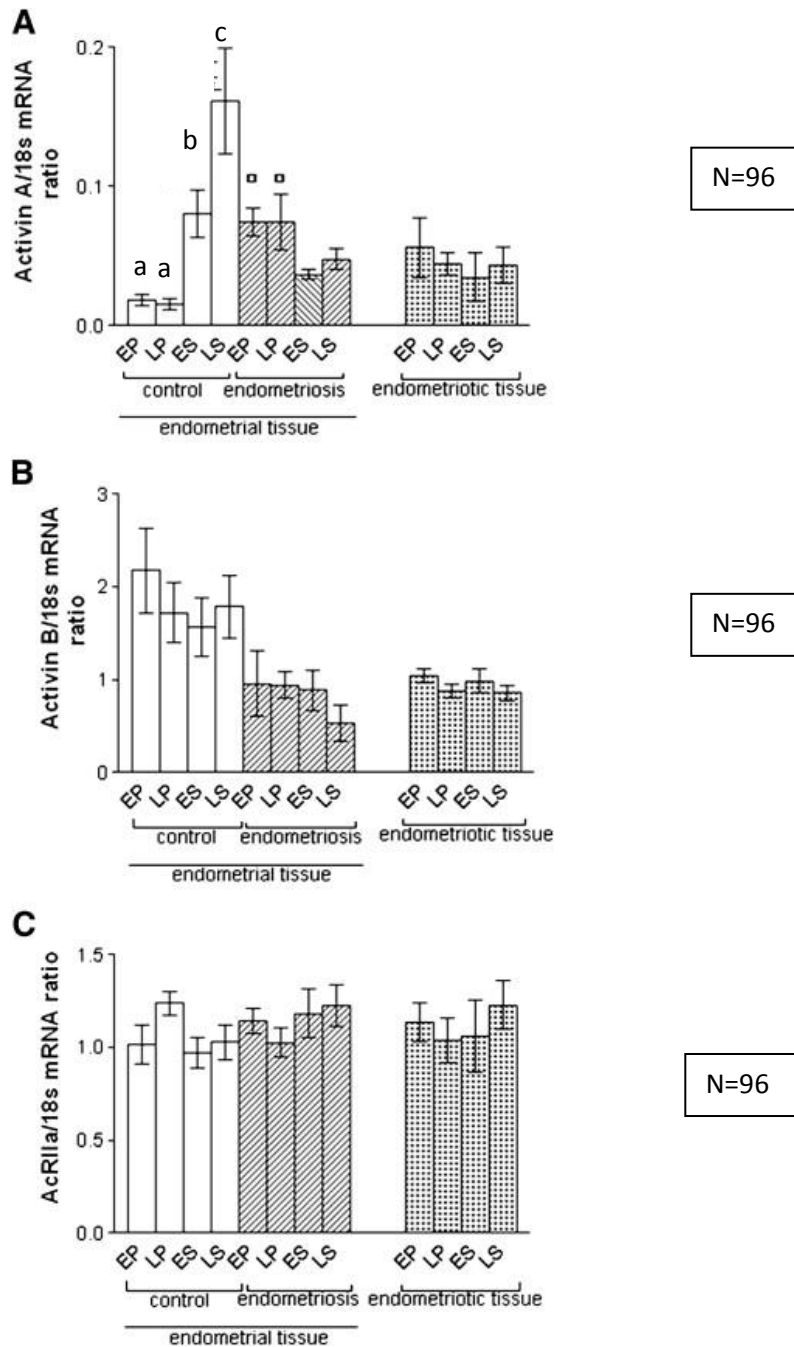


Figura 3. Expressão de (A) ativina A, (B) ativina B, e (C) ActRII mRNA no endométrio eutópico de pacientes saudáveis (control) e mulheres com endometriose (endometriosis) e tecido endometriótico (endometriotic tissue) durante as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos (ANOVA e teste de Turkey). $\square = p < 0,05$ fases proliferativas da endometriose versus controle. EP = early proliferative (proliferativa inicial); LP = late proliferative (proliferativa tardia); ES = early secretory (secretora inicial); LS = late secretory (secretora tardia).

1.1.2- Moduladores do receptor da ativina: nodal e cripto

A expressão do mRNA do nodal não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os controles e as pacientes com endometriose nas fases proliferativa e secretora (4A). No grupo controle, a expressão do mRNA do cripto foi muito maior durante a fase proliferativa ($P < 0.001$) do que durante a fase secretora. Nas pacientes com endometriose, a expressão do mRNA do cripto foi menor na fase proliferativa ($P < 0.05$), e não se demonstrou diferenças entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual (4B).

Figura 4

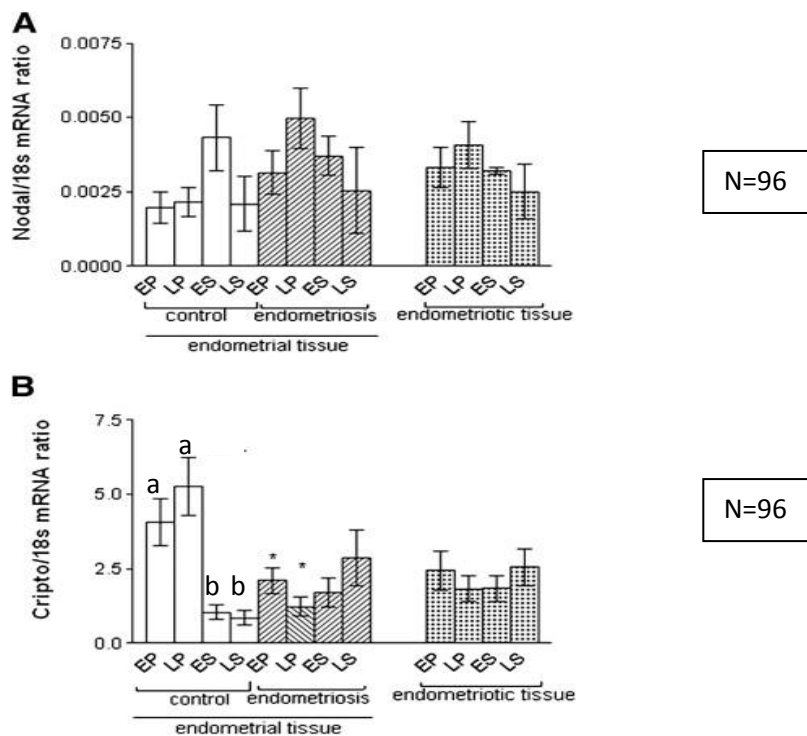


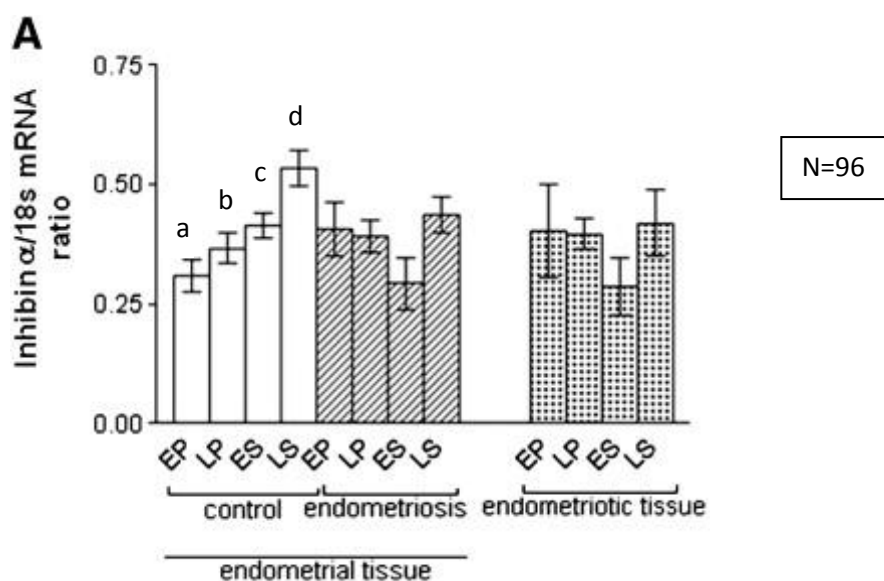
Figura 4- Expressão do mRNA de (A) nodal e (B) cripto no endométrio eutópico de pacientes saudáveis (controls) e mulheres com endometriose (endometriosis) e no tecido ectópico (endometriotic tissue), durante as fases proliferativa e secretora ciclo menstrual. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos (ANOVA e teste de Turkey). * = $p < 0,05$ fases proliferativas da endometriose versus controle. EP = early proliferative (proliferativa inicial); LP = late proliferative (proliferativa tardia); ES = early secretory (secretora inicial); LS = late secretory (secretora tardia).

1.1.3- Antagonista da ativina e proteína ligadora: inibina α e folistatina

A expressão do mRNA da inibina α foi diferente entre controles e pacientes com endometriose. As mulheres saudáveis apresentaram um aumento da expressão do mRNA da inibina α durante a fase secretora ($p < 0,05$ versus fase proliferativa). Nas pacientes com endometriose, não foi encontrada diferença na expressão da inibina α durante as fases do ciclo (Figura 5A).

A expressão do mRNA da folistatina no endométrio eutópico de pacientes controles não demonstrou variações entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual. Já nas pacientes com endometriose, ao contrário, a expressão do mRNA da folistatina foi maior ($p < 0,05$) na fase secretora do que na proliferativa (Figura 5B). A expressão de folistatina não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os controles e pacientes com endometriose.

Figura 5



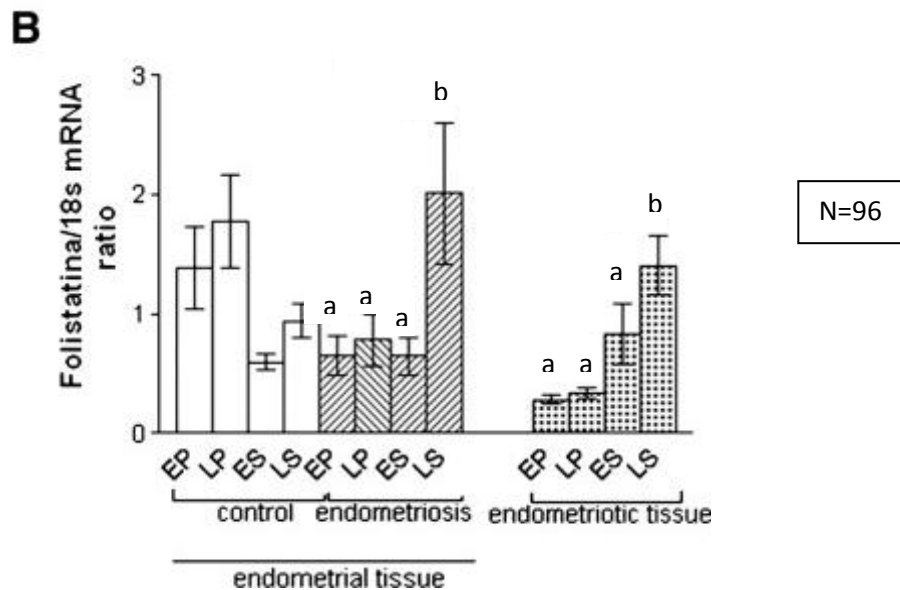


Figura 5. Expressão do mRNA de (A) inibina α e (B) folistatina endométrio eutópico de pacientes saudáveis (controls) e mulheres com endometriose (endometriosis) e no tecido ectópico (endometriotic tissue), durante as fases proliferativa e secretora ciclo menstrual. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos (ANOVA e teste de Turkey). EP = early proliferative (proliferativa inicial); LP = late proliferative (proliferativa tardia); ES = early secretory (secretora inicial); LS = late secretory (secretora tardia).

1.2- Tecido ectópico

Avaliou-se a expressão do mRNA das proteínas relacionadas com a ativina no tecido ectópico proveniente de endometriomas. As expressões dos mRNAs de ativina A, ativina B, receptor da ativina, nodal, cripto e inibina α não apresentaram diferenças entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, exatamente como encontrado no endométrio eutópico das pacientes com endometriose (Figuras 3, 4 e 5A). A expressão do mRNA da folistatina foi maior durante a fase secretora ($p < 0,05$ versus fase proliferativa) (Figura 5B).

2- Experimento 2- Avaliação dos níveis séricos de ativina A e folistatina em portadoras de endometriose

A ativina A foi detectada em todas as amostras analisadas. A sua concentração (média \pm desvio padrão) foi de 0.17 ± 0.01 ng/ml no grupo controle, 0.19 ± 0.01 ng/ml no grupo da endometriose peritoneal, 0.22 ± 0.01 ng/ml no grupo do endometrioma e 0.16 ± 0.02 ng/ml na endometriose profunda. No grupo dos endometriomas, os níveis séricos de ativina A foram mais altos que no grupo controle (Figura 6A).

A folistatina foi detectada em todas as amostras analisadas. A sua concentração (média \pm desvio padrão) foi de 1.69 ± 0.07 ng/ml no grupo controle, 2.24 ± 0.42 ng/ml no grupo da endometriose peritoneal, 2.34 ± 0.32 ng/ml no grupo do endometrioma e 1.50 ± 0.17 ng/ml na endometriose profunda. Nenhum grupo de pacientes com endometriose apresentou diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de folistatina quando comparados ao grupo controle (Figura 6B). Dentro dos grupos de endometriose, o nível sérico da folistatina foi mais alto nas pacientes com endometriose peritoneal e endometrioma.

Quando os dois marcadores foram combinados para gerar um índice de dois marcadores (*duo marker index*), o grupo com endometrioma apresentou um aumento significativo deste índice quando comparado com o grupo controle e com o grupo da endometriose profunda ($p < 0,01$). No grupo com endometriose peritoneal, o índice dos dois marcadores foi semelhante ao do grupo com

endometrioma, mas não permitiu uma distinção clara com os controles (Figura 6C).

A figura 6D mostra as curvas ROC da ativina A, folistatina e do índice dos dois marcadores para o diagnóstico de endometrioma versus controle. A área abaixo da curva da ativina foi 0.700 (95% de intervalo de confiança, 0.605-0.794), e da folistatina foi 0.620 (0.510-0.730). A combinação dos dois marcadores em um índice não melhorou significativamente suas acurácias diagnósticas. A área abaixo da curva ROC para o produto ativina A x folistatina foi 0.696 (0.596-0.795), o que não difere das área abaixo das curvas ROC de cada marcadores sozinho (Figura 6D). A acurácia dos marcadores foi modesta, como demonstrado na Tabela 5. Usando os pontos de corte que atingem 90% de especificidade, a sensibilidade e a razão de verossimilhança positiva foram respectivamente de 0,33 e 2,78 para ativina, 0.37 e 3.94 para folistatina e 0.41 e 4.41 para a combinação dos dois marcadores.

Figura 6

N=214

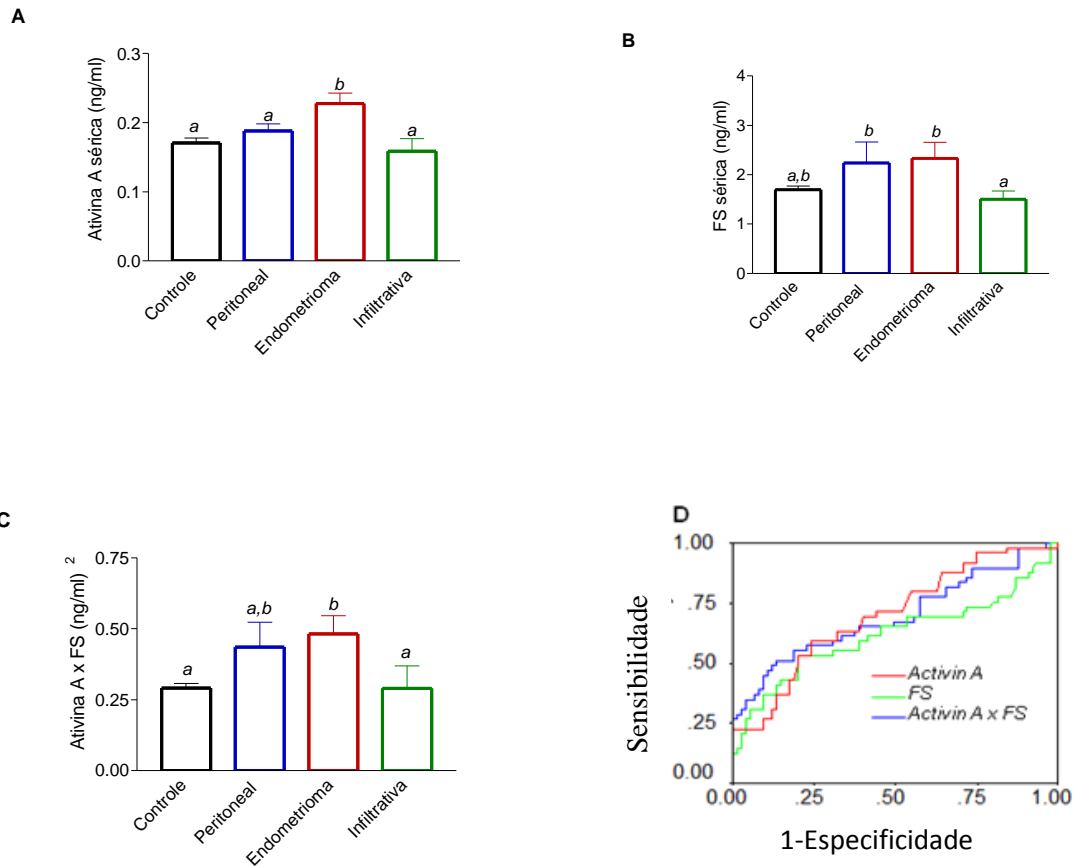


Figura 6- Níveis séricos de ativina A, folistatina (FS) e o produto ativina A x FS em mulheres com endometriose peritoneal, endometrioma e endometriose profunda, comparadas com o grupo controles sem endometriose. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos (ANOVA and Newman-Keuls test).

Tabela 6: Sensibilidade e razão de verossimilhança positiva correspondentes a 90% de especificidade na detecção do endometrioma com níveis séricos de ativina A, folistatina, ou ambos.

Marcador	Ponto de corte com 90% de especificidade	Sensibilidade	Razão de verossimilhança positiva
Ativina A	>0.25 ng/ml	0.33 (0.21-0.48)	2.78 (1.34-5.74)
Folistatina	>2.4 ng/ml	0.37 (0.23-0.52)	3.94 (1.78-8.72)
Duo Marker (Actvin A x Follistatin product)	>0.45 (ng/ml) ²	0.41 (0.28-0.56)	4.41 (2.03-9.60)

3- Experimento 3- Efeitos da ativina A e da folistatina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores de angiogênese em cultura *in vitro* de células derivadas de endométrio de mulheres sem e com endometriose.

A expressão do IL-6 RNAm foi significativamente maior em HESC derivadas de mulheres com endometriose, quando comparadas com as de mulheres sem endometriose (IL-6/18S $1,37 \pm 0,57$ vs. $0,53 \pm 0,21$, $p < 0,05$). A secreção basal de IL-6 também foi maior em HESC derivadas de mulheres com endometriose (498 ± 205 pg/ml) do que em HESC de mulheres sem endometriose (220 ± 181 pg / ml, $p < 0,05$). Ativina A em diferentes doses não teve efeito na expressão de IL-6 RNAm nas culturas (Figura 7A). Por outro lado, a ativina A inibiu a secreção de IL-6 apenas em HESC de mulheres com endometriose, e este efeito foi cancelado pela folistatina (Figura 7B). A expressão de IL-8 RNAm (IL-8/18S $2,90 \pm 0,82$ vs $0,39 \pm 0,08$) e a concentração da proteína IL-8 basais foram maiores em HESC de mulheres com endometriose do que nas mulheres sem endometriose (313 ± 72 vs 45 ± 16 pg / ml, $p < 0,01$). A adição de ativina A aumentou a expressão IL-8 RNAm e sua secreção em HESC de mulheres sem endometriose (Figuras 8A e 8B), mas não em HESC de mulheres com endometriose, que apresentaram apenas um pequeno aumento dos níveis de RNAm não traduzidos para secreção de proteínas. Ambos os efeitos foram bloqueados pelo folistatina ($p < 0,05$) (Figuras 8A e 8B).

VEGF RNAm (VEGF/18S $1,80 \pm 1,70$ vs $1,48 \pm 0,40$) e secreção (126 ± 62 vs 139 ± 82 pg / ml) não foram diferentes entre HESc derivadas de mulheres com

e sem endometriose. HESCs tratadas com doses crescentes de ativina A mostraram aumento dose-dependente da expressão e secreção de VEGF no grupo controle, mas não em mulheres com endometriose (Figuras 9A e 9B). Estes efeitos foram revertidos pela adição de folistatina (Figuras 9A e 9B).

Figura 7

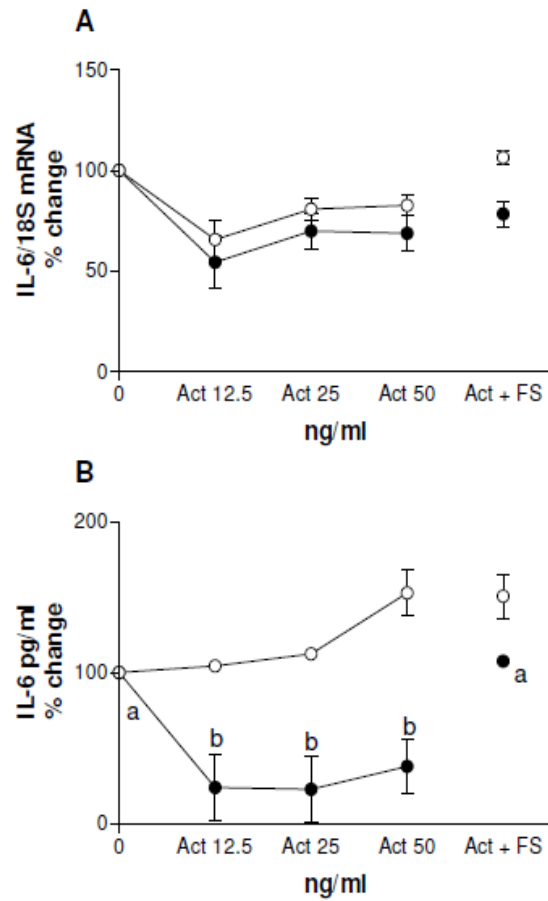


Figura 7- Variação percentual de IL-6 mRNA (A); e variação percentual da secreção (B) em HESCs de mulheres sem endometriose (controles, círculos abertos) e mulheres com endometriose (círculo preto), tratadas com diferentes concentrações de ativina A e folistatina (act 12,5 = ativina A a 12.5ng/mL; act 25 = ativina A a 25ng/mL; act 50 = ativina A a 50ng/mL; act + FS = ativina A a 25ng/mL mais folistatina em 250ng/mL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA e Newman-Keuls).

Figura 8

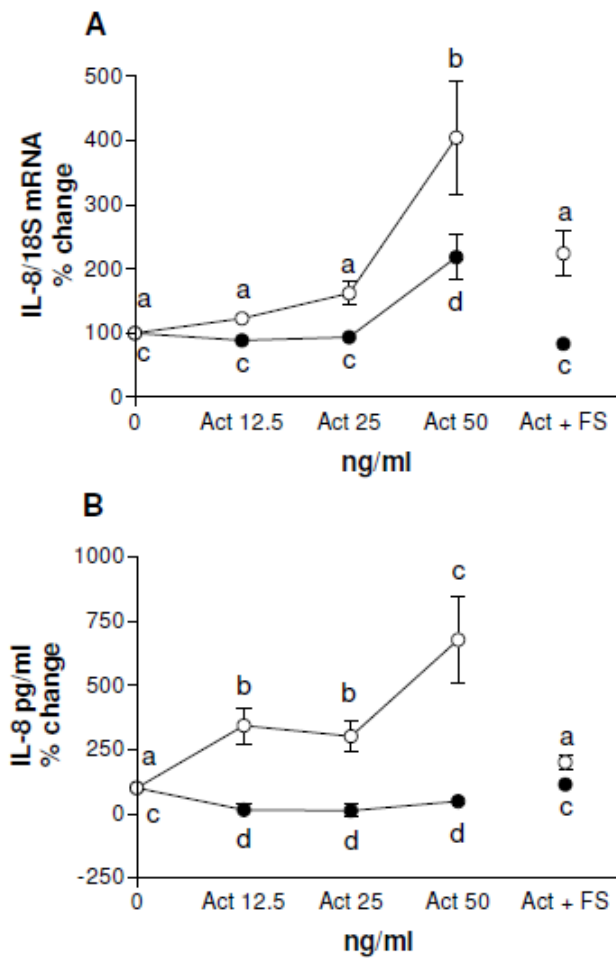


Figura 8- Variação percentual de IL-8 mRNA (A); e variação percentual da secreção (B) em HESCs de mulheres sem endometriose (controles, círculos abertos) e mulheres com endometriose (círculo preto), tratadas com diferentes concentrações de ativina A e folistatina (act 12,5 = ativina A a 12.5ng/mL; act 25 = ativina A a 25ng/mL; act 50 = ativina A a 50ng/mL; act + FS = ativina A a 25ng/mL mais folistatina em 250ng/mL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA e Newman-Keuls).

Figura 9

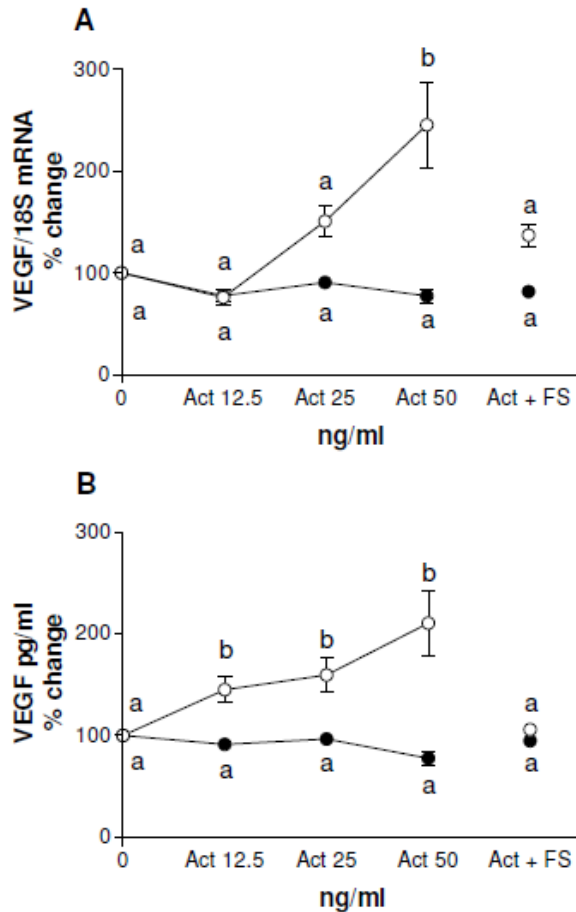


Figura 9- Variação percentual de VEGF mRNA (A); e variação percentual da secreção (B) em HESCs de mulheres sem endometriose (controles, círculos abertos) e mulheres com endometriose (círculo preto), tratadas com diferentes concentrações de ativina A e folistatina (act 12,5 = ativina A a 12.5ng/mL; act 25 = ativina A a 25ng/mL; act 50 = ativina A a 50ng/mL; act + FS = ativina A a 25ng/mL mais folistatina em 250ng/mL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA e Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

1- Experimento 1- Expressão de ativina A, proteínas relacionadas à ativina A e folistatina no endométrio e endometriose.

Nosso estudo mostrou que o endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose apresentam diferenças no padrão de regulação da ativina A durante as diferentes fases do ciclo menstrual. Em particular, a expressão do RNAm da ativina A, do cripto, e da inibina α não apresentaram alterações ao longo do ciclo menstrual, e observou-se aumento da expressão da folistatina RNAm durante a fase secretora tardia. Além disso, nosso estudo também revelou que a expressão dessas moléculas nos endometriomas apresenta as mesmas variações do endométrio eutópico durante o ciclo endometrial.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a associação entre a endometriose e a infertilidade, incluindo a distorção da anatomia pélvica, anormalidades endócrinas e ovulatórias e função imune mediada por células no endométrio (5,6). Os implantes de endometriose podem afetar a implantação do embrião (5,99), mas parece ocorrer também disfunção endometrial (5,100). Em mulheres com endometriose o atraso na maturação histológica e alterações bioquímicas no endométrio reforçam o papel da disfunção endometrial como contribuinte para a diminuição da fertilidade (5,99,101). De fato, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e os as urocortinas envolvidos na decidualização endometrial estão diminuídos em mulheres com endometriose (20). Hormônios esteróides estimulam a maior expressão local e síntese de várias proteínas ao longo das fases do ciclo endometrial e no início da gravidez. Estes peptídeos/proteínas localmente expressos participam da sinalização parácrina para outros tipos de células

modulando as funções endometriais; a disfunção na expressão de tais peptídeos/proteínas pode iniciar condições patológicas, como a infertilidade na endometriose.

Em nosso estudo, as mulheres com endometriose não apresentaram aumento da expressão ativina A RNAm durante a fase secretora. O aumento da expressão da ativina A RNAm durante a fase secretora de mulheres sem endometriose (67) parece ser um sinal de endométrio receptivo (66,67), promovendo a invasão do trofoblasto durante implantação do embrião (102). Portanto, a falta de qualquer alteração na fase secretora em mulheres com endometriose poderia estar relacionada a um endométrio infértil. Além disso, ativina A participa da neovascularização (87), aumenta a atividade da matriz metaloproteinase (MMP) (88), e está envolvida na infiltração de macrófagos na membrana basal em estados inflamatórios (89), suportando vários possíveis locais de ação da ativina A na patogênese da endometriose. Um estudo recente mostrou que a ativina A aumentou a capacidade de invasão das células endometriais ao peritônio *in vitro* (75).

A expressão do cripto RNAm em pacientes com endometriose não se alterou durante o ciclo endometrial, perdendo o pico de expressão na fase proliferativa exibido por mulheres sem endometriose. Portanto, mulheres com endometriose poderiam apresentar perda de controle da proliferação celular (65,67) devido à expressão reduzida deste antagonista da ativina durante a fase proliferativa.

A expressão da inibina α RNAm não se alterou em mulheres com endometriose, enquanto as mulheres sem a doença apresentaram maior expressão endometrial da subunidade α , durante a fase secretora tardia, como também demonstrado em estudos anteriores (65, 70, 91,103-105). Esta alteração na expressão da inibina α durante a fase secretora nas mulheres com endometriose pode contribuir ainda mais para a disfunção endometrial nesta mulheres.

A evidência de que mulheres com endometriose apresentam aumento da expressão endometrial da folistatina RNAm durante a fase secretora também pode contribuir para um efeito diminuído da ativina sobre as funções endometriais na endometriose. Além disso, a folistatina induz angiogênese e é mais expressa durante a proliferação e migração das células endoteliais (106), facilitando a invasão e proliferação das células endometrióticas. Até certo ponto, o aumento da expressão da folistatina pode ser considerado promotor da gênese da lesão de endometriose, uma vez que estimula angiogênese e proliferação celular (107).

Nosso estudo mostrou que o endométrio eutópico de mulheres com endometriose durante a fase secretora caracteriza-se pela diminuição da inibina α , aumento da expressão de folistatina RNAm, e de expressão alterada da ativina A, o que explica, em parte, a deficiência na decidualização e possivelmente afeta a implantação do embrião (5, 99,100). A menor taxa de gravidez em mulheres com endometriose pode estar relacionada com anormalidades no endométrio que resultam em falha na implantação do embrião (101). Algumas diferenças foram observadas

entre o endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose , em especial a redução das integrinas $\alpha\beta$ no momento da implantação (5,100), nível muito baixo da enzima envolvida na síntese do ligante endometrial para uma proteína presente na interface trofoblasto-blastocisto (5), e os genes que regulam a apoptose, transportadores de íons, fatores de transcrição, e outros que provavelmente são relevantes na falha da implantação e na patogênese da endometriose (101).

Além disso, nosso estudo demonstrou que endometriomas apresentam as mesmas variações do endométrio eutópico durante a ciclo menstrual. Isto sugere uma biologia comum para o endométrio eutópico e ectópico na endometriose, mas não indica se essas mudanças no endométrio eutópico são secundárias ao desenvolvimento das lesões endometrióticas ou são defeitos primários que permanecem no tecido ectópico. Outros estudos demonstraram diferenças entre o tecido ectópico e eutópico na endometriose. Os receptores de progesterona estão significativamente diminuídos, e há uma superexpressão patológica de ER β em células do estroma de mulheres com endometriose (2,108). No tecido endometriótico, a cascata esteroidogênica está anormalmente ativada, e são produzidas quantidades significativas de progesterona e estrogênio localmente (2, 21, 109).

2- Experimento 2- Avaliação dos níveis séricos de ativina A e folistatina em portadoras de endometriose.

A descoberta de novos biomarcadores permanece uma prioridade na pesquisa em endometriose (41). Devido à sensibilidade e especificidade limitadas dos sintomas clínicos (110,111), o uso de métodos laboratoriais não-invasivos é fundamental para otimizar a investigação diagnóstica, poupando as pacientes de intervenções cirúrgicas desnecessárias. Até agora, antígeno CA-125 permanece como único marcador sérico da endometriose, amplamente utilizado na prática clínica, apesar de sua baixa sensibilidade (112-114). Mesmo a combinação do CA-125 com múltiplos marcadores séricos, tais como o anticorpo anticardiolipina, soro amilóide A, interleucinas 6 e 8, fator de necrose tumoral α , CA-19-9 e a proteína C reativa de alta sensibilidade não alcançou acurácia diagnóstica desejada, porque nenhum desses marcadores é exclusivo para a endometriose (49,115).

A ativina A e a folistatina foram investigadas no presente estudo como potenciais marcadores diagnósticos para endometriose peritoneal, ovariana e profunda infiltrativa . Estas moléculas foram escolhidas porque são produzidas e secretadas pelo endométrio humano e por implantes de endometriose (85,92,116) e podem ser quantificadas no soro periférico com métodos confiáveis e acessíveis. Além disso, em estudo preliminar foi observado que mulheres com endometrioma de ovário apresentavam concentrações plasmáticas aumentadas de folistatina (53).

Os nossos resultados, no entanto, mostram apenas um aumento discreto de ativina A em endometrioma de ovário e pequena diferença nas concentrações de folistatina entre mulheres com endometriose profunda infiltrativa e mulheres com as outras formas de endometriose. A combinação de ambos os marcadores não aumentou o desempenho diagnóstico do que cada um isoladamente, como mostrado pela análise da curva ROC. Estes resultados apontam para uma apresentação heterogênea da doença, com liberação variável de biomarcadores: enquanto um número significativo de pacientes têm maiores níveis séricos de ativina A e folistatina, um outro número expressivo de mulheres com endometriose não apresenta qualquer elevação desses marcadores.

A ativina A é altamente concentrada no fluido cístico de endometriomas ovarianos (85), e é abundante na fase proliferativa do endométrio de mulheres com endometriose, como mostrado no primeiro experimento desta tese (117). A baixa sensibilidade desta proteína como marcador diagnóstico provavelmente está relacionada com sua expressão tecidual variável que, por sua vez, reflete as várias apresentações fenotípicas das lesões de endometriose.

3- Experimento 3- Efeitos da ativina A e da folistatina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores de angiogênese em cultura *in vitro* de células derivadas de endométrio de mulheres sem e com endometriose.

O presente estudo mostrou pela primeira vez que a ativina A é capaz de modular a expressão e secreção de IL-8 e VEGF em HESC. Estes efeitos foram revertidos pela adição do seu antagonista específico, a folistatina, demonstrando um efeito direto da ativina A. O presente estudo também demonstra que HESC não estimuladas de mulheres com endometriose secretam mais IL-6 e IL-8 que os controles. IL-6 é uma proteína potente e multifuncional, expressa por macrófagos, com efeitos na reparação tecidual e inflamação (17,118-120); sua secreção é aumentada por alguns sinais, como a IL-1, em estados inflamatórios (121-123). IL-6 é um ativador de macrófagos (121) e é expressa e produzida por células estromais endometrióticas (124). Além disso, IL-6 promove a proliferação celular endometrial (125). IL-6 também parece estar envolvida no estímulo à angiogênese (126). A secreção de IL-6 é maior no líquido peritoneal de pacientes com endometriose, e sua concentração é maior em tecido endometrial ectópico (127-130). Estes achados sugerem a participação da IL-6 na patogênese da endometriose. Esta citocina, que foi inibida pela ativina A no presente estudo, poderia ser alvo de imunomodulação através da ativina A no endométrio de mulheres com endometriose.

IL-8 é uma citocina pró-inflamatória que induz à quimiotaxia de neutrófilos e têm um potente efeito estimulante sobre a angiogênese (131-133). VEGF está

entre os mais potentes e específicos fatores angiogênicos. Seus efeitos incluem proliferação de células endoteliais, sua migração, a organização em túbulos, e maior permeabilidade, participando da cascata angiogênica (134). A expressão endometrial do VEGF é aumentada pelo estrogênio, e pode ser correlacionados com neovascularização e aumento da permeabilidade vascular durante a fase proliferativa tardia (135). Os presentes resultados permitem-nos hipotetizar que, pela estimulação tanto da IL-8 quanto do VEGF, de maneira específica e dose-dependente, a ativina A apresenta um mecanismo adicional para promover a receptividade endometrial e a vascularização saudável.

Outra observação interessante deste estudo é o rompimento do efeito da ativina A nas células de mulheres com endometriose. No primeiro experimento desta tese, observamos que ativina A apresenta um padrão alterado de expressão durante o ciclo menstrual no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (117). O cripto, um antagonista natural do receptor da ativina, e a folistatina, proteína ligadora da ativina, também demonstraram padrão cíclico alterados no endométrio de mulheres com endometriose (117); tais alterações do endométrio eutópico poderiam afetar a fertilidade nestas mulheres. A falta do efeito da ativina A na secreção de IL-8 e VEGF em HESC de mulheres com endometriose pode ser devido à sensibilidade diminuída ou modulação anormal da ação da ativina. Estes resultados suportam a hipótese de que o endométrio eutópico de mulheres com endometriose é disfuncional e pode contribuir para a diminuição da fertilidade em tais mulheres.

O presente estudo demonstra que a ativina A inibe a secreção de IL-6 em HESC de mulheres com endometriose (não nos controles), e isto ocorre, possivelmente, devido ao fato de que estas células têm uma maior atividade inflamatória, como sugerido pelo aumento da secreção basal de citocinas. Há evidências consistentes indicando que a endometriose é uma doença inflamatória crônica (13,19) e a resposta inflamatória aumentada provavelmente contribui para o estabelecimento da doença.

Ativina A induziu à maior expressão e secreção de IL-8 em HESC de controles e estes efeitos foram cancelados pela adição de folistatina, demonstrando um efeito direto da ativina A na expressão e secreção desta citocina inflamatória. A secreção de IL-8, que foi significativamente maior no grupo com endometriose (secreção basal), foi diferentemente modificada pelo tratamento com ativina A, mostrando um efeito inibitório sobre a secreção de IL-8, que foi cancelado por folistatina. Além disso, a expressão basal de IL-8 RNA foi significativamente maior no grupo com endometriose. IL-8 é uma citocina pró-inflamatória que induz à quimiotaxia de neutrófilos e têm um potente efeito estimulante sobre a angiogênese (131-133). IL-8 estimula a proliferação celular (133) e está elevada no líquido peritoneal de mulheres com endometriose (133,136-139). IL-8 pode desempenhar papel importante na inflamação na endometriose e poderia contribuir para a manutenção dos implantes ectópicos. Ativina A tem um efeito pró-inflamatório, quando aumenta a expressão e secreção de IL-8 nos controles. Na endometriose, a expressão de IL-8 mRNA foi estimulado pela ativina A, na maior dose, enquanto que a secreção de IL-8 foi diminuída com a adição de ativina A em

todas as doses testadas. Os mecanismos envolvidos na produção de proteínas são complexos e uma expressão aumentada não significa uma secreção também aumentada. A ativina A parece agir como anti-inflamatório no grupo com endometriose, no qual a expressão e a secreção de IL-8 foram significativamente mais elevados. Este dado também reforça possível alvo de imunomodulação da ativina A no endométrio de mulheres com endometriose.

Alguns estudos demonstraram que a ativina A é mais expressa em várias doenças inflamatórias crônicas, como doença inflamatória do intestino (140), colite ulcerativa (118,140), artrite reumatóide (141), insuficiência cardíaca (142-144) e fibrose pulmonar intersticial (145), e pode desempenhar papel importante na regulação do processo inflamatório. A ativina A induziu aumento da expressão e secreção do VEGF no grupo controle. VEGF é um potente fator angiogênico envolvido na angiogênese fisiológica e patológica. A angiogênese parece ser parte importante da patogênese da endometriose (146-150). Alguns estudos têm demonstrado que o VEGF pode estar envolvido no progresso das lesões endometrióticas (151,152). Um estudo anterior demonstrou aumento na expressão do VEGF RNAm no tecido endometriótico, em fases iniciais, em comparação com endométrio eutópico (153). Por outro lado, dois outros estudos não detectaram qualquer aumento nos níveis de VEGF no endometrioma (154,155). Estas diferenças poderiam ser explicadas pela redução na atividade angiogênica observada em estágios avançados da endometriose (150,155). O presente estudo demonstrou que a expressão e secreção de VEGF são diferentemente reguladas pela ativina A em HESCs de mulheres com e sem endometriose. Em HESC de mulheres

com endometriose, a ativina A não aumentou a expressão ou secreção de VEGF. A expressão do receptor da ativina ActRII não é alterada no tecido endometriótico (86,117), como demonstrado no primeiro experimento desta tese e em outro trabalho do grupo; portanto, a explicação do motivo pelo qual a ativina A não aumenta a liberação de VEGF nas células das mulheres com endometriose pode estar na expressão dos outros receptores de ativina como ALK4; na expressão de diferentes proteínas que regulam as ações de ativina A, tais como folistatina *like*-proteína e cripto, ou em mecanismos colaterais induzidos pela ativina A, que poderiam resultar na diferente regulação do VEGF. A ativina A apresenta efeito estimulante direto na expressão e secreção de VEGF nos controles uma vez que a expressão e secreção do VEGF está aumentada em HESCs de mulheres sem endometriose tratadas com ativina A e este efeito é abolido quando tais células foram tratadas com ativina A mais folistatina. Em HESC de mulheres com endometriose, a ativina A sozinha ou com folistatina não alterou a expressão ou secreção do VEGF.

6. CONCLUSÕES

- O endométrio proliferativo e secretor de mulheres com endometriose é caracterizado por alterações na expressão de RNAm de ativina A, cripto, inibina α e folistatina, demonstrando que o endométrio eutópico é diferente entre mulheres com e sem endometriose.
- Os endometriomas apresentaram as mesmas alterações do endométrio eutópico durante o ciclo endometrial, o que suporta a ideia de atividade biológica semelhante entre estes dois tecidos endometriais na endometriose.
- A disfunção da ativina A no endométrio endometriótico pode contribuir para a ocorrência de infertilidade em mulheres com endometriose.
- Em mulheres com endometrioma, os níveis séricos de ativina A podem estar aumentados em comparação com pacientes sem endometriose.
- Quanto à folistatina, houve diferenças entre os grupos com endometriose, com níveis séricos mais elevados de folistatina na endometriose peritoneal e ovariana em comparação com endometriose infiltrativa profunda.
- O índice de marcador duplo foi significativamente maior em mulheres com endometrioma, mas não conseguiu distinguir pacientes com endometriose peritoneal de controles saudáveis.
- A ativina A e a folistatina não contribuem para detecção de endometriose peritoneal ou profunda infiltrativa e apresentam acurácia diagnóstica limitada para endometrioma.

- Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a patogênese da endometriose. Existem evidências consistentes indicando que a endometriose é um estado crônico inflamatório em que as respostas imune e inflamatória contribuem para seu estabelecimento.
- As respostas imunes e inflamatórias são induzidas pelas interações de muitos peptídeos / proteínas expressos localmente, que participam na sinalização parácrina para outros tipos de células, a fim de modular funções no endométrio. Disfunções destes peptídeos/proteínas podem contribuir para condições patológicas, tais como a infertilidade na endometriose.
- A ativina A participa da neovascularização, aumenta a atividade de MMPs e está envolvida na infiltração de macrófagos na membrana basal em estados inflamatórios. Além disso, a ativina A aumenta a capacidade das células do endométrio para invadir peritônio *in vitro*.
- A ativina A estimula a expressão e secreção de IL-8 e VEGF *in vitro* em HESCs de mulheres sem endometriose. Este efeito é específico e dose-dependente, sugerindo que os efeitos da ativina A são mais amplos do que aqueles atualmente conhecidos e, na verdade incluem importantes vias de remodelação do endométrio.
- A secreção basal de IL-6 e IL-8 é aumentada em HESC de mulheres com endometriose. Nestas culturas, houve uma interrupção no efeito da ativina A, acrescentando novos mecanismos candidatos à patogênese da disfunção endometrial nesta doença complexa.

- A ativina A parece ter efeitos anti-inflamatórios na regulação da secreção de IL-6 e IL-8 em tecidos com maior atividade inflamatória, quando a secreção basal dessas citocinas é muito mais elevada, como em células HESC de mulheres com endometriose.

Referências

- 1- GIUDICE, L.C. Clinical practice. Endometriosis, *N Engl J Med* v.362 , p. 2389–2398, 2010.
- 2- BULUN,S.E. Endometriosis, *N Engl J Med* v. 360, p. 268–279,2009.
- 3- GIUDICE, L.C; Kao L.C. Endometriosis. *Lancet*. V. 364, p.1789-99, 2004.
- 4- MURPHY, A.A. Clinical aspects of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. v. 955, pp.1-10; discussion 34-6, 396-406, 2002.
- 5- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril*. v.86(5 Suppl 1):S156-60, 2006.
- 6- Holoch K.J; LESSEY B.A. Endometriosis and infertility, *Clin Obstet Gynecol* v.53, p. 429–438, 2010.
- 7- NAP,W; GROOTHUIS, P.G; DEMIR, A.Y; EVERS, J.L; DUNSELMAN, G.A. Pathogenesis of endometriosis, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* v.18, p. 233–244, 2004
- 8- Brosens,I. Endometriosis and the outcome of in vitro fertilization, *Fertil Steril* v.81, p. 1198–1200, 2004.
- 9- Nisolle, M; Donnez J, Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities, *Fertil Steril* v.68, p. 585–595, 1997.
- 10-SAMPSON, J.A. Ovarian hematomas of endometrial type (perforating hemorrhagic cysts of the ovary) and implantation adenomas of endometrial type, *Boston Med Surg J* v.186, p. 445–473, 1922.

- 11-SAMPSON, J.A. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity, *Am J Obst Gynecol* v.14, p. 442–469, 1927.
- 12-Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Manual de Orientação Endometriose. Rio de Janeiro: FEBRASGO, 2011. 141p.
- 13-Jones KL, de Kretser DM, Patella S, Phillips DJ. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Mol Cell Endoc.*2004;225: 119-25.
- 14-Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, de Kretser DM. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitam Horm.* 2011;85:255-97.
- 15-Taylor RN, Yu J, Torres PB, Schickedanz AC, Park JK, Mueller MD, et al. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci.* 2009;16(2):140-6.
- 16-Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* v.79, p. 643–649, 1994.
- 17-Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* v.81, p.174–179, 1996.
- 18-Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, Giudice LC. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod* v.15, p. 625–631, 2009.
- 19- Aghajanova L, Hamilton A, Kwintkiewicz J, Vo KC, Giudice LC. Steroidogenic enzyme and key decidualization marker dysregulation in endometrial stromal

- cells from women with versus without endometriosis. *Biol Reprod* v.80, p. 105–114, 2009.
- 20-Novembri, R; Borges L.E; Carrarelli, P; Rocha, A.L; De Pascalis, F.; Florio, P; Petraglia, F. Impaired CRH and urocortin expression and function in eutopic endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. Published online February 2, 2011.
- 21-Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*. v.248, p. 94-103, 2006.
- 22-Simpson, JL; Elias, S; Malinak, LR; Buttram Jr, VC. Heritable aspects of endometriosis, I: genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* v.137, p. 327–331, 1980.
- 23-Kennedy, S; Mardon, H; Barlow, D. Familial endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. V.12, p. 32–34, 1995.
- 24-Stefansson, H; Geirsson, RT; Steinthorsdottir, V; ET AL, Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum Reprod* v.17, p. 555–559, 2002.
- 25-Moen, MH. Endometriosis in monozygotic twins, *Acta Obstet Gynecol Scand*.v. 73, p. 59–62, 1994.
- 26-Hadfield, RM; Mardon, HJ; Barlow, DH; Kennedy, SH. Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril* v.68, p. 941–942, 1997.
- 27-Treloar, SA; O'Connor, DT; O'Connor, VM; Martin, NG. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril* v.71, p. 701–710, 1997.

- 28-Leibovic, DI; Mueller, MD; Taylor, RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* v.75, p. 1–10, 2001.
- 29-Koninckx, PR; Kennedy, SH; Barlow, DH. Endometriotic disease: the role of the peritoneal fluid. *Hum Reprod Update*.v.4, p. 741–751, 1998.
- 30-Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* v.56, p. 45–51, 1991.
- 31-Chegini N. Peritoneal molecular environment, adhesion formation, and clinical implication. *Front Biosci* v.1, p. e91–e115, 2002.
- 32-Gazvani R; Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* v.123, p. 217–226, 2002.
- 33-Bedaiwy MA; Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis: clinicopathological implications. *Minerva Ginecol* v. 55, p. 333–345, 2004.
- 34-Badawy SZ, Cuenca V, Stitzel A, Tice D. Immune rosettes of T and B lymphocytes in infertile women with endometriosis, *J Reprod Med* v.32, p. 194–197, 1987.
- 35-Nothnick ,WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease, *Fertil Steril* v.76, p. 223–240, 2001.
- 36-Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D' Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E. ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE

- guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Human Reproduction*.v.20, p.2698-2704, 2005.
- 37- Arruda MS, Petta CA, Abrao MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms of diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Human Reprod*.v. 18(4), p. 756-59, 2003.
- 38-Pittaway DE. Diagnosis of endometriosis. *Infertil Reprod Med Clin North Am*. v.3, p.619-31, 1992.
- 39-Farquhar C. Endometriosis. *BMJ*.v.334(7587),p.249-53, 2007.
- 40-HURTADO R. Análise inter e intra-observador no diagnóstico anátomo-patológico de endometriose. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- 41-Rogers PA, D' Hooghe TM, Fazleabas A, Gargett CE, Giudice LC, Montgomery GW, Rombauts L, Salamonsen LA, Zondervan KT. Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod Sci*. V.16, p.335-346, 2009.
- 42-Kabawat SE, Bast RC Jr, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J Gynecol Pathol*. v.2, p.275-285, 1983.
- 43-Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*. v.276; p.27371-27375, 2001.
- 44-Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, Bossuyt PM. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril*.v.70, p. 1101-1108, 1998.

- 45-Schenken RS. Pathogenesis, clinical features, and diagnosis of endometriosis.
<http://www.uptodate.com>
- 46-Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM. The role of CA125 in clinical practice. *J Clin Pathol*.v.58, p. 308-312, 2005.
- 47-Somigliana E, Vercellini P, Viganò P, Benaglia L, Crosignani PG, Fedele L. Non-invasive diagnosis of endometriosis: the goal or own goal? *Hum Reprod*.v.25(8), p.1863-8, 2010.
- 48-Vercellini P, Somigliana E, Viganò P, Abbiati A, Barbara G, Crosignani PG. Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach. *Hum Reprod*.v.24(2),p.254-69, 2009.
- 49-Abrão MS, Podgaec S, Filho BM, Ramos LO, Pinotti JA, de Oliveira RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod*.v.12, p.2523-2527, 1997.
- 50- Somigliana E, Viganò P, Tirelli AS, Felicetta I, Torresani E, Vignali M, Di Blasio AM. Use of the concomitant serum dosage of CA 125, CA 19-9 and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions. *Hum Reprod*.v.19, p.1871-1876, 2004.
- 51-Bedaiwy MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta*.v.340,p.41-56, 2004.
- 52- Florio P, Reis FM, Torres PB, Calonaci F, Toti P, Bocchi C, Linton EA, Petraglia F. Plasma urocortin levels in the diagnosis of ovarian endometriosis. *Obstet Gynecol*;110:594-600, 2007.

- 53-Florio P, Reis FM, Torres PB, Calonaci F, Abrao MS, Nascimento LL, Franchini M, Cianferoni L, Petraglia F. High serum follistatin levels in women with ovarian endometriosis. *Human Reproduction*. V.24, p.2600-2606, 2009.
- 54-Flores I, Rivera E, Mousses S, Chen Y, Rozenblum E. Identification of molecular markers for endometriosis in blood lymphocytes by using deoxyribonucleic acid microarrays. *Fertil Steril*. v.85,p.1676-1683, 2006.
- 55-Evers JL, Van Steirteghem AC. All that glistens is not gold. *Hum Reprod*. V.24,p.2972-2973, 2009.
- 56- Derynck R.; Miyazono K. TGF- β and the TGF-b family. In: R. Derynck and K. Miyazono, Editors, *The TGF- β family*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ,p. 29–43, 2008.
- 57-Harrison C.A.; Wiater E.; Gray P.C.; Greenwald J.; Choe S; Vale W. Modulation of activin and BMP signaling. *Mol Cell Endocrinol*. v.225, p. 19–24, 2004.
- 58-Omwandho CO, Konrad L, Halis G, Oehmke F, Tinneberg HR. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod*. V.25(1),p.101-9, 2010.
- 59-Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*. V.132(2), p.217-32, 2006.
- 60-Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary fsh is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*.v.321,p.779–782, 1986.

- 61-Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature*.v.321,p.776–779, 1986.
- 62-WIATER, E; VALE, W. Activins and Inhibins. In: R. Derynck and K. Miyazono, Editors, *The TGF- β family*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ,p. 79-107, 2008.
- 63-Salamonsen, L.A; Lathbury, L.J. Endometrial leukocytes and menstruation, *Hum Reprod Update* v.6, p. 16–27, 2000.
- 64-Leung P.H., Salamonsen L.A.; J.K. Findlay. Immunolocalization of inhibin and activin subunits in human endometrium across the menstrual cycle. *Hum Reprod*. V. 13, p. 3469–3477, 1998.
- 65-Jones R.L., Salamonsen L.A., Critchley H.O., Rogers P.A., Affandi B.; J.K. Findlay. Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only contraception. *Mol Hum Reprod*. v.6, p. 1107–1117, 2000.
- 66-Florio P., Rossi M., Viganò P., Luisi S., Torricelli M.; Torres P.B; et al. Interleukin 1-beta and progesterone stimulate activin a expression and secretion from cultured human endometrial stromal cells. *Reprod Sci* v.14, p. 29–36, 2007.
- 67-Florio P., Severi F.M., Luisi S., Ciarmela P., Calonaci G.; Cobellis L. et al. Endometrial expression and secretion of activin A, but not follistatin, increase in the secretory phase of the menstrual cycle. *J Soc Gynecol Investig* v. 10, p. 237–243, 2003.

- 68-Jones R.L., Salamonsen L.A.; Findlay J.K. Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* v. 87, p. 4001–4004, 2002.
- 69-Tierney E.P.; L.C. Giudice. Role of activin A as a mediator of in vitro endometrial stromal cell decidualization via the cyclic adenosine monophosphate pathway. *Fertil Steril* v. 81 , p. 899–903, 2004.
- 70-Horne A.W., van den Driesche S., King A.E., Burgess S., Myers M.; Ludlow H. et al., Endometrial inhibin/activin beta-B subunit expression is related to decidualization and is reduced in tubal ectopic pregnancy, *J Clin Endocrinol Metab* v. 93, p. 2375–2382, 2008.
- 71-Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* v.65,p. 973–982, 1991.
- 72-Mathews LS, Vale WW. Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation. *J Biol Chem* v.268, p. 19013–19018, 1993.
- 73-Tsuchida K, Mathews LS, Vale WW. Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. *Proc Natl Acad Sci* v.90,p.11242–11246, 1993.
- 74-Wrana JL, Attisano L. The smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.11, p.5–13, 2000.
- 75-Ferreira MC, Witz CA, Hammes LS, Kirma N, Petraglia F, Schenken RS, Reis FM. Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in vitro model of human peritoneum. *Mol Hum Reprod.* v.14(5),p.301-7, 2008.

- 76-Kumar A., Novoselov V., Celeste A.J., Wolfman N.M., Dijke P., Kuehn M.R.
Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads, *J Biol Chem* v.276,p. 656–661, 2001.
- 77-Shen M.M. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* v. 134, p. 1023–1034, 2007.
- 78-Topczewska J.M., Postovit L.M., Margaryan N.V., Sam A., Hess A.R.; Wheaton W.W. et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* v. 12, p. 925–932, 2006.
- 79-Kelber J.A., Shani G., Booker E.C., Vale W.W.; Gray P.C. Cripto is a noncompetitive activin antagonists that forms analogous signaling complexes with activin and nodal. *J Biol Chem* v. 283, p. 4490–4500, 2008.
- 80-Shani G., Fischer W.H., Justice N.J., Kelber J.A., Vale W. ; Gray P.C. GRP78 and cripto form a complex at the cell surface and collaborate to inhibit transforming growth factor beta signaling and enhance cell growth. *Mol Cell Biol* v. 28, p. 666–677, 2008.
- 81-Papageorgiou I., Nicholls P.K., Wang F., Lackmann M., Mankanji Y. ; Salamonsen L.A. et al. Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. *Reprod Biol Endocrinol* v. 7, p. 122, 2009.
- 82-Harrison C.A., Gray P.C., Vale W.W.; Robertson D.M. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metabol* v.16, p.79–82, 2005.
- 83-Sidis Y., Mukherjee A., Keutmann H., Delbaere A., Sadatsuki M.; Schneyer A.
Biological activity of follistatin isoforms and follistatin-like-3 is dependent on

- differential cell surface binding and specificity for activin, myostatin, and bone morphogenetic proteins, *Endocrinology* v. 147, p. 3586–3597, 2006.
- 84-de Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJ. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type ii receptors. *Mol Cell Endocrinol* v.116, p.105–114, 1996.
- 85-Reis F.M., Di Blasio A.M., Florio P., Ambrosini G., Di Loreto C. ; Petraglia F. Evidence for local production of inhibin A and activin A in patients with ovarian endometriosis. *Fertil Steril* v. 75, p. 367–373, 2001.
- 86-Torres P.B., Florio P., Galleri L., Reis F.M., Borges L.E.; Petraglia F. Activin A, activin receptor type II, nodal, and cripto mRNA are expressed by eutopic and ectopic endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reprod Sci* v. 16 ,p. 727–733, 2009.
- 87-Poulaki V., Mitsiades N., Kruse F.E., Radetzky S., Iliaki E.; Kirchhof B. et al., Activin A in the regulation of corneal neovascularization and vascular endothelia growth factor expression, *Am J Pathol* v.164 p. 1293–1302, 2004.
- 88-Yoshinaga K., Mimori K., Inoue H., Kamohara Y., Yamashita K.; Tanaka F. et al., Activin A enhances MMP-7 activity via the transcriptional factor AP-1 in an esophageal squamous cell carcinoma cell line, *Int J Oncol* v.33,p. 453–459, 2008.
- 89-Ogawa K., Funaba M., Mathews L.S.; Mizutani T. Activin A stimulates type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) production in mouse peritoneal macrophages, *J Immunol* v. 165 p. 2997–3003, 2000.

- 90-Worbs S., Shabani N., Mayr D., Gingelmaier A., Makrigiannakis A.; Kuhn C. et al., Expression of the inhibin/activin subunits ($-\alpha,-\beta A,-\beta B$) in normal and carcinogenic endometrial tissue: possible immunohistochemical differentiation markers. *Oncol Rep* v.17, p. 97–104, 2007.
- 91-Mylonas I., Jeschke U., Wiest I., Hoeing A., Vogl J.; Shabani N. et al., Inhibin/activin subunits alpha, beta-A and beta-B are differentially expressed in normal human endometrium throughout the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol* v.122, p. 461–471, 2004.
- 92-Torres PB, Florio P, Ferreira MC, Torricelli M, Reis FM, Petraglia F. Deranged expression of follistatin and follistatin-like protein in women with ovarian endometriosis. *Fertil Steril* v.88,p.200-205, 2007.
- 93-Gray PC, Harrison CA, Vale W. Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci* v. 100, p.5193-5198, 2003.
- 94-Khoury RH, Wang QF, Crowley WF, Jr., Hall JE, Schneyer AL, Toth T et al. Serum follistatin levels in women: evidence against an endocrine function of ovarian follistatin. *J Clin Endocrinol Metab* v.80, p.1361-8, 1995.
- 95-Foster CM, Olton PR, Padmanabhan V. Diurnal changes in FSH-regulatory peptides and their relationship to gonadotrophins in pubertal girls. *Hum Reprod* v. 20,p.543-8, 2005.
- 96-Kettel LM, DePaolo LV, Morales AJ, Apter D, Ling N, Yen SS. Circulating levels of follistatin from puberty to menopause. *Fertil Steril* v. 65, p.472-6, 1996.

- 97-Noyes RW , Hertig AT , Rock J . Dating the endometrial biopsy . *Fertil Steril.* v.1:3–9, 1950.
- 98-Catalano R.D., Critchley H.O., Heikinheimo O., Baird D.T., Hapangama D., Sherwin J.R.A. et al., Mifepristone induced progesterone withdrawal reveals novel regulatory pathways in human endometrium, *Mol Hum Rep* v. **13**,p. 641–644, 2007.
- 99-Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril.* V. 75, p.1–10, 2001
- 100- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, et al. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* v.79,p.643–9, 1994.
- 101- Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* v.144,p. 2870–81, 2003.
- 102- Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology* v.138,p.3976–86,1997.
- 103- American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril* v.43,p.351–2, 1985.
- 104- Mylonas I, Jeschke U, Winkler L, Makovitzky J, Richter DU, Briese V, et al. Immunohistochemical expression of inhibin-alpha in human endometrium and the in vitro secretion of inhibin, estradiol and cortisol in cultured human endometrial glandular cells. *Arch Gynecol Obstet* v. 268,p. 142–50,2003.

- 105- Mylonas I, Makovitzky J, Richter DU, Jeschke U, Briese V, Friese K. Expression of the inhibin-alpha subunit in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis. *Gynecol Oncol* v. 93,p.92–7,2004.
- 106- Kozian DH, Ziche M, Augustin HG. The activinbinding protein follistatin regulates autocrine endothelial cell activity and induces angiogenesis. *Lab Invest* v. 76,p.267–76,1997.
- 107- Florio P, Ciarmela P, Toti P, Maguer-Satta V, Rimokh R, Buonocore G, et al. Human endometrium and decidua express follistatin-related gene (FLRG) mRNA and peptide. *Mol Cell Endocrinol* v. 218,p.129–35,2004.
- 108- Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, et al. Estrogen receptor-b, estrogen receptor-a, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med* v.28,p.36–43,2010.
- 109- Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, et al. Deficient 17b-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17b-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* v.83,p.4474–80, 1998.
- 110- Djalali S, Janson D, Altgassen C, Agic A, Diedrich K, Hornung D. Quality of the clinical diagnosis of endometriosis *J Endometriosis* v. 1,p.46-51, 2009.
- 111- Carneiro MM, Filogônio IDS, Costa LMP, Ávila I, Ferreira MC. Accuracy of clinical signs and symptoms in the diagnosis of endometriosis. *J Endometriosis* v.2,p.63-70, 2010.

- 112- Duleba AJ. Diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* v. 24,p.331-46,1997.
- 113- Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM, Simsa P, Pochet N, De Smet F, et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum Reprod* v. 25,p.654-64,2010.
- 114- Patrelli TS, Berretta R, Gizzo S, Pezzuto A, Franchi L, Lukanovic A, et al. CA 125 serum values in surgically treated endometriosis patients and its relationships with anatomic sites of endometriosis and pregnancy rate. *Fertil Steril* v.95,p.393-62,011.
- 115- Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM, Simsa P, Pochet N, De Smet F, et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum Reprod* v. 25,p. 654-64,2010.
- 116- Florio P, Luisi S, Viganò P, Busacca M, Fadalti M, Genazzani AR, et al. Healthy women and patients with endometriosis show high concentrations of inhibin A, inhibin B, and activin A in peritoneal fluid throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* v.13,p. 2606-11,1998.
- 117- Rocha AL, Carrarelli P, Novembri R, Sabbioni L, Florio P, Reis FM, et al. Endometrial dysfunction of activin pathway in endometriosis. *Fertil Steril* v. 95,p.2241-6,2011.
- 118- Smith C, Yndestad A, Halvorsen B, Ueland T, Wæhre T, Otterdal K, et al. Potential anti-inflammatory role of activin A in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*.v. 44, p. 369–375, 2004.

- 119- Mahnke JL, Dawood MY, Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*.v.73(1), p-166-70,2000.
- 120- Saito A, Osuga Y, Yoshino O, Takamura M, Hirata T, Hirota Y, et al. TGF- β 1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. *Hum Reprod*.v.26(7)p:1892-8,2011.
- 121- Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* v.54:1,p.-781, 993.
- 122- Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* v.16, p.249–84,1998.
- 123- Sironi M, Breviario F, Proserpio P, Biondi A, Vecchi A, Van Damme J, Dejana E, Mantovani A. L-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol*. V.142(2),p.549-53,1989.
- 124- Tsudo T, Harada T, Iwabe T, Tanikawa M, Nagano Y, Ito M, et al. Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil Steril*.v.73(2),p205-11,2000.
- 125- Giudice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril*. V.61(1),p-1-17,1994.
- 126- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi B-Z. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* v.271,p.736–41,1996.

- 127- Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS, Caudle MR. Interferon gamma(IFN-g) and interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* v. 32,p.180 –3,1994.
- 128- Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* v.174,p.1522– 61,996.
- 129- Schroder W, Gaetje R. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in peritoneal fluid and serum of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* v.23,p.10–4,1996.
- 130- Koyama N, Matsuura K, Okamura H. Cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Int J Gynecol Obstet*, v.43,p.45–50,1993.
- 131- Park CC, Morel JC, Amin MA, Connors MA, Harlow LA, Koch AE. Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. *J Immunol*. 2001;167(3):1644-53.
- 132- Koch AE, Volin MV, Woods JM, Kunkel SL, Connors MA, Harlow LA, et al. Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum*. 2001;44(1):31-40.
- 133- Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;955:101-9.
- 134- Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription

- by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(20):10972-10977.
- 135- Li XF, Gregory J, Ahmed A. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor in human endometrium. *Growth Factors*. 1994;11(4):277-282
- 136- Ryan, I.P., J.F. Tseng, E.D. Schriock et al. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil. Steril*. 1995;63: 929–932.
- 137- Arici, A., S.I. Tazuke, E. Attar et al. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol. Hum. Reprod*. 1996; 2:40–45.
- 138- Gazvani, M.R., S. Christmas, S. Quenby et al. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to stage of disease. *Hum. Reprod*. 1998; 13: 1957–1961.
- 139- Iwabe, T., T. Harada, T. Tsudo et al. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil. Steril*. 1998; 69: 924–930.
- 140- Hübner G, Brauchle M, Gregor M, Werner S. Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? *Lab Invest*. 1997;77(4):311-8.
- 141- Gribi R, Tanaka T, Harper-Summers R, Yu J. Expression of activin A in inflammatory arthropathies. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;30;180(1-2):163-7.

- 142- Michel U, Ebert S, Phillips D, Nau R. Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicemia. *Eur J Endocrinol.* 2003;148:559–564
- 143- Ota F, Maeshima A, Yamashita S, Ikeuchi H, Kaneko Y, Kuroiwa T, et al. Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2442–2449.
- 144- Oikonomou E, Tousoulis D, Siasos G, Zaromitidou M, Papavassiliou AG, Stefanadis C. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. *Hellenic J Cardiol.* 2011;52(1):30-40.
- 145- Matsuse T, Ikegami A, Ohga E, Hosoi T, Oka T, Kida K, et al. Expression of immunoreactive activin A protein in remodeling lesions associated with interstitial pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*1996;148:707–13.
- 146- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998;13:1686-1690.
- 147- McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000;6:45-55.
- 148- Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Romeu A, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression. *Fertil Steril* 2009;92:1214-1220.
- 149- Tan XJ, Lang JH, Liu DY, Shen K, Leng JH, Zhu L. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:148-153.

- 150- Ramón LA, Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, Gilabert J, España F, Chirivella M, et al. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum Reprod*. 2011;26(5):1082-90.
- 151- Laschke MW, Menger MD In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007;13:331-342.
- 152- Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2006;21:262-268.
- 153- Takehara M, Ueda M, Yamashita Y, Terai Y, Hung YC, Ueki M. Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis. *Hum Pathol* 2004;35:1369-1375.
- 154- Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Vila V Réganon E, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: its relation to fibrinolytic and metalloproteinase (MMP) systems. *Hum Reprod* 2007;22:2120-2127
- 155- Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fert Steril* 1997;68:585-596.