

Universidade Federal de Minas Gerais

**Efeitos da Ativina A, Inibina A e folistatina sobre
células endometriais em um modelo de adesão e
invasão peritoneal *in vitro***

Márcia Cristina França Ferreira

Belo Horizonte

2007

Márcia Cristina França Ferreira

**Efeitos da Ativina A, Inibina A e folistatina sobre
células endometriais em um modelo de adesão e
invasão peritoneal *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
do Departamento de Fisiologia e Biofísica da
Universidade Federal de Minas Gerais para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Co-orientadores: Prof. Robert S. Schenken, MD

Prof. Craig A. Witz, MD

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2007

Aos meus pais e irmãos, presença e amor incondicional
sempre. *“You’re my everything...”*

Às mulheres, que possam ter suas dores amenizadas,
sem que se perca a magia de seus enigmas...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao meu orientador, Professor Fernando Marcos dos Reis, por acreditar em mim e aceitar orientar este trabalho, pelos inúmeros ensinamentos, pela sabedoria, paciência e dedicação. Por ser sempre para mim um exemplo a ser seguido.

Aos Professores Craig A. Witz e Robert S. Schenken, por me receberem e co-orientarem em San Antonio e por todo o suporte e disposição nesta jornada.

Ao Dr. Nameer Kirma, pelas discussões e orientações fundamentais.

Ao Dr. Richard S. Lucidi e a Peter Binkley, por me ensinarem o cotidiano do trabalho no laboratório de cultura celular.

A Anitha Nair e Luciano Hammes, dois grandes colaboradores que caminharam e sofreram comigo durante os experimentos. Verdadeiros presentes que este trabalho me trouxe: amigos que estarão sempre em minhas lembranças.

A Juliana Carneiro, Virgínia Pereira e Helen Del Puerto, pela solicitude e por dividirem comigo sua experiência.

Ao Dr. Wylie Vale, pelos anticorpos que tão gentilmente nos cedeu.

Aos Professores Adelina, Cândido e Umeko, pela acolhida no laboratório e por todos os ensinamentos.

Ao Dr. Rajeshwar R. Tekmal, por me abrir as portas de seu laboratório para a realização de partes dos experimentos.

À Professora e amiga Márcia Mendonça, pelas inúmeras colaborações e pelas discussões sempre tão profundas e embasadas. Aos amigos Juliana Barra, Daniela Bouissou e Eric, pelo suporte em momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, em especial a Cláudio, Laura, Renato, Daniel, Luciana, Janine, André, Patrícia, Kinulpe e Samuel.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Humana, pelo estímulo na busca do conhecimento científico e pela amizade.

Ao Enrico, grande amigo, pelo incentivo e apoio constantes.

A Philip Pauerstein, Joe England, Jaspreet Shidu, Alisson Kischner, Ya Guang e Hareesh Nair, pela ajuda e pelo bom humor de sempre.

A Lynda Barnett, Javette Sheppard-Dukes, April McCleave, Noemi Ortiguerra, que sempre me atenderam tão bem no Departamento e se tornaram amigas.

Aos amigos Fabiano Nery, Serap, Benício, Daniela, Renato Natalino, Sheila, Terri Binkley, Mark Lane, Jani Jensen, Alex Märtins, Renata Prado e “aos brasileiros de San Antonio”.

Aos meus pais, Cornélio e Geralda, base sólida, origem de ensinamentos para toda a vida.

Aos meus irmãos, Marisa, Bráulio e Breno, que me ensinaram a apreciar a diversidade.

Ao Professor Aroldo Camargos, impulso na direção do academicismo e da ciência, por me ensinar que a gratidão é a maior virtude que uma pessoa pode possuir.

Creio ter aprendido... Sou grata à vida, com todas as suas vicissitudes, por me trazer até aqui hoje.

“Como se o insólito da invenção fosse a única coisa que importasse, testemunho do poder infinito dos mágicos... Vocês podem alterar o cenário à vontade, em todo o lugar é sempre a mesma coisa: tudo vai bem enquanto se discutem os objetos. Mas a coisa começa a ficar complicada se o intrometido começa a percorrer o caminho que vai dos objetos produzidos ao sonho dos produtores.”

Rubem Alves

“Não era à toa que ela entendia os que buscavam seu caminho. Como buscava arduamente o seu! E como hoje buscava com sofreguidão e aspereza o seu melhor modo de ser, o seu atalho, já que não ousava mais falar em caminho.”

Clarice Lispector

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura Celular da Divisão de Endocrinologia Reprodutiva e Infertilidade do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade do Texas em San Antonio e no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ÍNDICE GERAL	Pág. i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
1. Ativinas, Inibinas e Folistatinas	2
Ativina A	4
Proteínas ligadoras de ativina	8
Inibinas	10
2. Endometriose	12
Conceito, manifestações e epidemiologia	12
Histórico e teorias	13
Mecanismos etiopatogênicos	16
3. Ativina A, endométrio e endometriose	24
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
1. Cultura de células	32
Cultura de células mesoteliais	32
Cultura de células endometriais	33
2. Tratamentos	36

Ativina A	36
Antagonistas: Folistatina e Inibina A	36
3. Ensaio	38
Preparo das células endometriais	38
Ensaio de invasão	38
Ensaio de adesão	43
Ensaio de proliferação	45
4. Imunocitoquímica	46
5. PCR em tempo real	48
6. Análise estatística	50
RESULTADOS	51
1. Efeitos da ativina A na taxa de invasão de células endometriais no modelo de peritônio	52
2. Efeitos da ativina A nas taxas de adesão de células endometriais às células mesoteliais	55
3. Efeitos da ativina A nas taxas de proliferação de células endometriais	56
4. Efeitos da ativina A na expressão de caderina E e caderina N em células endometriais	57
5. Demonstração dos receptores de ativina nas células endometriais	60
DISCUSSÃO	61

CONCLUSÃO

75

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

77

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
1	Representação esquemática de inibinas e ativinas [extraída de Ethier JF and Findlay JK, <i>Reproduction</i> (2001), 121: 667-675].	3
2	Representação da cascata intracelular de sinalização da ativina [extraída de Ethier JF and Findlay JK, <i>Reproduction</i> (2001), 121: 667-675]	7
3	Representação do mecanismo de ação da folistatina e da inibina no antagonismo da ativina [extraída de Ethier JF and Findlay JK, <i>Reproduction</i> (2001), 121: 667-675]	11
4	Preparação dos modelos de invasão e adesão. Incubação das placas de 24 poços e 96 poços com células mesoteliais.	40
5	Diagrama usado para fotografar câmaras de invasão na quantificação do ensaio	41
6	Processo de contagem das células no ensaio de invasão I	42
7	Processo de contagem das células no ensaio de invasão II	43
8	Gráficos mostrando as taxas de invasão de células endometriais epiteliais e estromais através do modelo de peritônio	54
9	Gráficos representando taxas de adesão de células endometriais epiteliais e estromais à monocamada de células mesoteliais	55
10	Gráficos mostrando leituras de absorvância proporcionais às taxas proliferação de células endometriais epiteliais e estromais	56
11	Gráficos de amplificação do PCR em tempo real	58
12	Gráficos representando a expressão de RNAm de caderinas E e N por células endometriais epiteliais e estromais	59
13	Fotomicrografia mostrando localização imunocitoquímica dos receptores de ativina em células endometriais	60

ÍNDICE DE TABELAS

N°		Pág.
1	Conjuntos de oligonucleotídeos usados no PCR em tempo real	49

LISTA DE ABREVIATURAS

- ActRI (A ou B) – Receptor de Ativina Tipo I (A ou B)
- ActRII (A ou B) – Receptor de Ativina Tipo II (A ou B)
- ALK – do ingles, *activin receptor-like kinase*
- BAMBI – do ingles, *BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*
- BMP – do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*
- CA 125 – do inglês, *Cancer Antigen 125*, marcador tumoral
- CD 44 – do inglês, *Cluster of Differentiation 44*, molécula de adesão
- cDNA – DNA complementar
- CDS – Solução de Dissociação Celular
- CMFDA – Diacetato de 5 clorometilfluoresceína
- CO₂ – Dióxido de carbono
- C-Smads – do inglês, *Common-Smads*
- csFCS – do inglês, *heat inactivated charcoal stripped Fetal Calf Serum*
- DAB – 3,3'-diaminobenzidina
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMEM/F-12 – Meio composto de partes iguais dos meios DMEM e F-12
- DMSO – Dimetil Sulfóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- DNase – Desoxirribonuclease
- D-PBS – Tampão fosfato de Dulbecco, sem cálcio ou magnésio
- EGF – Fator de Crescimento Epitelial
- FAST – do inglês, *Forkhead Activin Signalling Transducer*
- FLRG – do inglês, *Follistatin Related Gene*
- FS-288 – folistatina, forma curta
- FS-303 – folistatina, forma intermediária
- FS-315 – folistatina, forma longa
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
IL – Interleucina
INhBP/p20 – Proteína ligadora de inibina/p120
I-Smads – do inglês, *Inhibitory-Smads*
JPEG – do inglês, *Joint Photographic Experts Group*
LP9 – linhagem de células mesoteliais peritoneais
LPS – Lipopolissacáride
MEM – *Minimal Essential Medium α -modification*
MMP – Matriz-metaloproteinase
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NK – *Natural killer*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PRA – Receptor tipo A da progesterona
PRB – Receptor tipo B da progesterona
RGB – do inglês, *Red-Blue-Green*
RNA – Ácido ribonucléico
mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro
R-Smads – do inglês, *Receptor-Smads*
SBF – Soro bovino fetal
SPARC – do inglês, *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*
TGF β – Fator de crescimento e transformação beta
TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

Objetivo: Este estudo visa investigar se ativina A tem efeito na adesão e invasão de células endometriais em um modelo de peritônio *in vitro*.

Métodos: Células endometriais estromais e epiteliais em cultura foram tratadas com ativina A (concentrações de 6.25 a 50 ng/ml) e com ativina A 25 ng/ml isolada em associação com inibina A ou folistatina. As células foram marcadas com fluorescência verde e colocadas sobre uma monocamada de células mesoteliais LP-9 num ensaio de invasão em Matrigel®. A expressão de moléculas de adesão, caderinas E e N, foi avaliada por *Real Time* PCR.

Resultados: Ativina A (25 ng/ml) promoveu um aumento na invasão de células endometriais através do modelo de peritônio (211 ± 36 percento do controle, $p < 0.05$), e este efeito foi parcialmente revertido por seus antagonistas naturais inibina A e folistatina. Ativina A não teve nenhum efeito na adesão das células endometriais às células mesoteliais ou na proliferação *in vitro* das células endometriais. Além disto, ativina A promoveu a diminuição da expressão do mRNA da caderina E em células epiteliais em cultura ($p < 0.05$).

Conclusão: Ativina A aumenta invasão de células endometriais epiteliais e estromais através do modelo de peritônio humano, e este efeito pode ser, ao menos em parte, relacionado à *down-regulation* da expressão de

caderina E nas células endometriais epiteliais. Estes achados sugerem que ativina A é capaz de facilitar o processo pelo qual células endometriais invadem o peritônio para formar os implantes endometrióticos.

Palavras-Chave: Ativina, inibina, folistatina, endometriose, endométrio, peritônio, caderinas.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate whether activin A has an effect in the attachment and invasion of endometrial cells in a modeled peritoneum *in vitro*.

Methods: Cultured endometrial stromal and epithelial cells were treated with activin A (concentration range 6.25 to 50 ng/ml) and with activin A 25 ng/ml alone or associated to inhibin A or follistatin. Cells were labeled fluorescent green and added to a monolayer of confluent LP-9 mesothelial cells in a Matrigel® invasion assay. The expression of cell adhesion proteins N-cadherin and E-cadherin was evaluated by Real Time PCR.

Results: Activin A (25 ng/ml) promoted an increase in invasion of the endometrial cells through the modeled peritoneum (211 ± 36 percent of control levels, $p < 0.05$), and this effect was partially reversed by its natural antagonists inhibin A and follistatin. Activin A had no effect in the attachment of the endometrial cells to the mesothelial cells or in the *in vitro* proliferation of endometrial cells. In addition, activin A induced a decreased mRNA expression of E-cadherin in cultured endometrial epithelial cells ($p < 0.05$).

Conclusion: Activin A increases invasion of endometrial epithelial cells and endometrial stromal cells into modeled human peritoneum, and this effect may be at least in part related to down-regulation of E-cadherin expression in endometrial epithelial cells. These findings suggest that activin A is able to facilitate the process by which endometrial cells invade the peritoneum to form endometriotic implants.

Key-words: Activin, inhibin, follistatin, endometriosis, endometrium, peritoneum, cadherins.

1. INTRODUÇÃO

1. ATIVINAS, INIBINAS E FOLISTATINAS

A descoberta, há cerca de 70 anos, da inibina como um supressor da secreção hipofisária de hormônio foliculo-estimulante (FSH) e as tentativas de purificação da molécula levaram ao isolamento de frações capazes de estimular a produção de FSH por células da hipófise e à identificação da ativina como um homodímero de subunidades β da inibina. Subseqüentemente, identificou-se o receptor de ativina e foi também isolada a folistatina, que provou ser um neutralizador da ativina, através de ligação de alta afinidade com a mesma. Os avanços na pesquisa destas moléculas mostraram que elas são produzidas e secretadas conjuntamente numa variedade de tecidos. Este fato tem atraído a atenção para as ações autócrinas e parácrinas de ativina, inibina e folistatina, mais do que seus papéis como reguladores endócrinos (Buster, 2003).

As ativinas e inibinas são membros da superfamília do *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), assim como o hormônio antimülleriano e as *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) (Chen et al., 2006). Inibinas e ativinas são glicoproteínas diméricas resultantes de combinações distintas de subunidades α (18 kDa) e β (14 kDa). Existem 02 tipos de subunidade β (β A e β B) e uma subunidade α que, combinados, formam 02 tipos de inibina e 03 tipos de ativina. As inibinas A e B são formadas pela união entre uma cadeia α a cadeia β correspondente. Já as ativinas A, AB e B são formadas por diferentes combinações de 2 cadeias β , respectivamente, β A + β A, β A + β B, e β B + β B (Ethier e Findlay, 2001).

Recentemente, foi descrita a existência de outras três subunidades β de ativina: β_C , clonada de DNA humano, β_D , clonada em *Xenopus laevis* e β_E , clonada em DNA de ratos. Entretanto, a atividade biológica destas moléculas ainda está para ser determinada. A descoberta destas subunidades nos dá a possibilidade de existirem 5 homodímeros e 10 heterodímeros de ativina (Fig 1). Em seres humanos, a subunidade β_D ainda não foi demonstrada, mas os dímeros ativina C, ativina E, ativina AC, ativina AE e ativina BC são descritos. Se estes dímeros são funcionais é um ponto obscuro, assim como seus possíveis papéis, entretanto, a subunidade β_C parece atenuar as funções da ativina A, formando o dímero AC e subseqüentemente evitando a formação de formas biologicamente ativas de ativina (Chen et al., 2006; Fang et al., 1996; Oda et al., 1995; Schmitt et al., 1996).

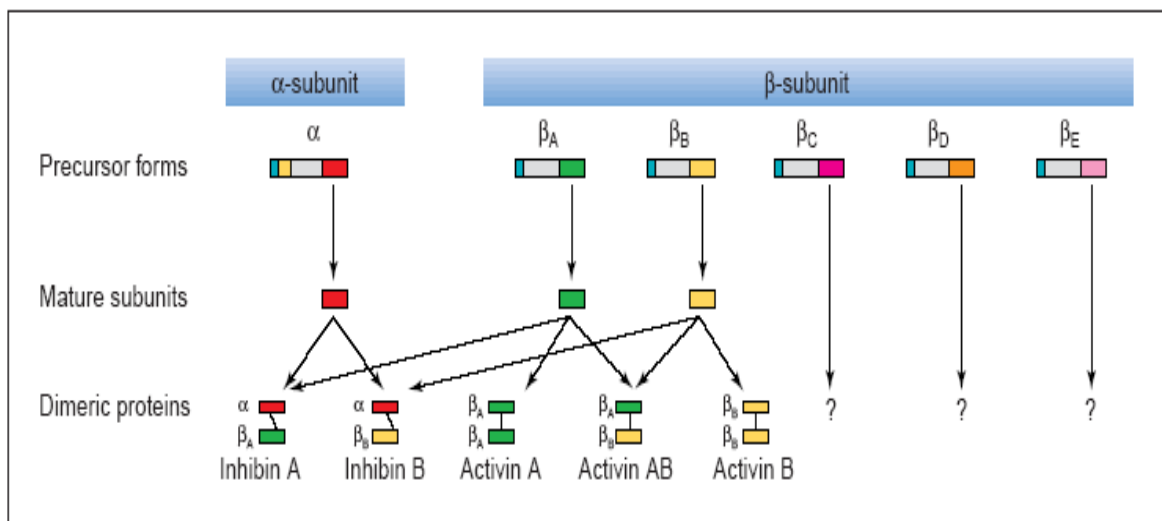


Figura 1 – Representação esquemática de inibinas e ativinas. Os peptídeos sintetizados como precursores são processados, produzindo as porções C-terminais maduras. A associação de subunidades α e β produz inibinas e de duas subunidades β produz as ativinas [extraída de Ethier JF and Findlay JK, Reproduction (2001), 121: 667-675].

1.1 Ativinas

Além de sua ação endócrina estimuladora da produção de gonadotrofinas, as ativinas têm sido relacionadas à neoangiogênese, ao controle de tônus vascular, neuroproteção, secreção hormonal, diferenciação e crescimento celular e modulação imunológica, sendo presentemente considerada um fator de crescimento/citocina, atuando também como mediador autócrino e parácrino.

A ativina A, assim como a folistatina, parece estar intimamente ligadas à proliferação de células endoteliais e à regulação da angiogênese (Kozian et al., 1997). O endotélio endometrial produz subunidades βA e βB , receptores de ativina e folistatina. Nestas células, a ativina A age como inibidor autócrino e parácrino da angiogênese, ao contrário da folistatina, que está presente em maiores proporções durante a proliferação e migração de células endoteliais.

Estudos mostram que ativina tem efeitos importantes no processo de cicatrização cutânea, levando a uma aceleração do mesmo e resultando em espessamento da epiderme e maior área cicatricial em ratos. Além disto, ativina parece diminuir o dano isquêmico cerebral e aumentar a sobrevivência de neurônios mesencefálicos e hipocâmpais, atuando como agente neuroprotetor (Sulyok et al., 2004).

A ativina A tem sido ainda associada com processos inflamatórios, incluindo artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e processos inflamatórios e regenerativos cíclicos do endométrio. Entretanto, seu papel

exato nas respostas inflamatórias ainda é desconhecido, pois têm sido descobertas ações pró e anti-inflamatórias.

Estudos demonstraram que a expressão de mRNA da ativina A é estimulada por mediadores pró-inflamatórios, como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), γ -interferon e lipopolissacáride (LPS). Em resposta a estímulo com LPS em modelo experimental de inflamação aguda, a ativina é secretada juntamente com proteínas de fase aguda, como TNF- α e interleucina-6 (IL-6). Ações anti-inflamatórias foram propostas, tendo em vista a capacidade da ativina A de antagonizar as ações biológicas da IL-6 (Jones et al., 2004; Phillips et al., 2001).

Este complexo *milieu* de ações na resposta inflamatória está ainda longe de ser universalmente esclarecido; entretanto, pode-se afirmar que as ações modulatórias sobre a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias dependem, em grande parte, do tipo celular envolvido (Jones et al., 2004; Phillips et al., 2001).

No sistema reprodutor feminino, a ativina exerce funções marcantes no controle da secreção hormonal, atuando nos gonadotrofos hipofisários e promovendo a secreção de FSH induzida pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Bilezikjian et al., 2004). A ativina B se constitui num produto primordialmente hipofisário, com ações autócrinas e parácrinas, enquanto a ativina A é produzida pelo ovário, pelo endométrio, pela placenta, pelo tecido mamário e pela hipófise (Ethier e Findlay, 2001; Luisi et al., 2001).

No endométrio humano, a produção de ativina A varia em função do ciclo menstrual, com quantidades crescentes durante a fase folicular, atingindo um platô na fase secretora (Florio et al., 2003; Jones et al., 2000; Jones et al., 2002a; Jones et al., 2002c).

O mecanismo clássico de ação celular da ativina envolve a ligação a receptores transmembrana, que desencadeiam uma cascata de fosforilação proteica intracelular. Existem dois tipos de receptores de ativina: *Activin Receptor Type II* (ActRII) e *Activin Receptor Type I* (ActRI). A ligação da ativina se faz com o ActRII, acontecimento que recruta o ActRI e promove sua ativação. O ActRI ativado fosforila uma molécula de transdução da família *Smad* (*Smad 2* ou *Smad 3*), que então interage com a *Smad 4* e este complexo se transloca para o núcleo, onde promove expressão gênica. O complexo ativado de *Smads* pode se ligar ao DNA diretamente ou requerer um co-fator, como por exemplo o FAST (*Forkhead Activin Signalling Transducer*), para promover a transcrição gênica (Attisano et al., 2001; Attisano e Tuen Lee-Hoeflich, 2001; Chen et al., 2006).

A família *Smad* é um conjunto de moléculas responsáveis pela sinalização intracelular da ativina e de outros membros da família do TGF- β . Existem três classes dessas moléculas de transdução: as *Receptor Smads* (*R-Smads*), que são as proteínas ativadas pela subunidade RI do receptor, as *Common Smads* (*C-Smads*), mediadores comuns que formam um complexo heteromérico com as *R-Smads* e translocam para o núcleo para ativar respostas gênicas específicas, e as *Inhibitory Smads* (*I-Smads*), que são potentes

inibidores do sinal da ativina. As *R-Smads* envolvidas na sinalização da ativina são as *Smads* 2 e 3; a *C-Smad* é a *Smad* 4 e as *I-Smads* são as de número 6 e 7. BMPs e outras moléculas da família do TGF- β sinalizam preferencialmente via diferentes *Smads* (Attisano et al., 2001; Attisano e Tuen Lee-Hoeflich, 2001).

Já foram identificados dois subtipos de receptores tipo II (ActRIIA e ActRIIB) e dois subtipos de receptores tipo I (ActRIA ou ALK2 – *activin receptor-like kinase 2* – e ActRIB ou ALK4). Entretanto, o ActRIA parece ser um receptor intimamente relacionado às BMPs e ao hormônio antimülleriano, indicando que o ActRIB é o principal receptor tipo I envolvido no mecanismo de ação da ativina (Ethier e Findlay, 2001; Harrison et al., 2004).

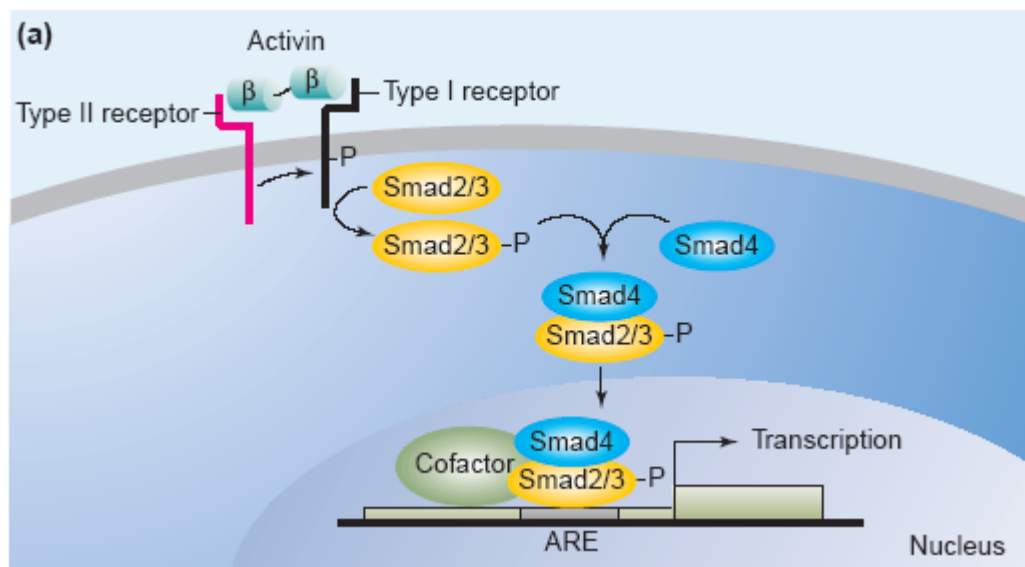


Figura 2 – Representação da cascata intracelular de sinalização da ativina [extraída de Ethier JF and Findlay JK, *Reproduction* (2001), 121: 667-675].

1.2 Proteínas ligadoras de ativina

Várias proteínas ligadoras de ativina, que apresentam papéis importantes na regulação da sua sinalização, já foram identificadas, com ações extracelulares ou intracelulares. Embora apresentem funções semelhantes, os padrões de expressão e as ações apresentam diferenças potencialmente significativas.

1.2.1 Folistatina

A folistatina é uma glicoproteína produzida juntamente com a ativina. No endométrio, é produzida nas células epiteliais glandulares e nas células estromais decidualizadas. Além de sua ação endócrina de inibição da síntese e secreção de FSH e da resposta do FSH ao GnRH, a folistatina tem o importante papel de antagonizar as ações promovidas pela ativina. A folistatina é o principal regulador da bioatividade da ativina, ligando-se a ela com alta afinidade e impedindo sua interação com o ActRII (Fig. 3).

Existem 3 isoformas de folistatina: FS-315 e FS-288, geradas por diferenças no processamento pós-transcricional (*splicing variants*), e FS-303, gerada por clivagem proteolítica a partir da FS-315 (de Winter et al., 1996). A forma longa, FS-315, por não se ligar aos proteoglicanos de membrana, é a principal forma circulante; a forma curta FS-288, que se liga aos proteoglicanos das membranas celulares, parece ter um importante papel no clareamento do excesso de ativina, por internalização e degradação do complexo folistatina-

ativina (Chen et al., 2006; Ethier e Findlay, 2001; Jones et al., 2002b). A FS-303 é a principal forma encontrada no líquido folicular (de Winter et al., 1996).

Parece haver uma diferença significativa na ligação da folistatina com as isoformas de ativina, uma vez que a afinidade da folistatina pela ativina A é cerca de 10 vezes maior que sua afinidade pela ativina B (Chen et al., 2006), de forma que a folistatina é particularmente importante no antagonismo da ativina A.

1.2.2 Gene relacionado à folistatina (*Follistatin-related gene, FLRG*)

Moléculas semelhantes à folistatina têm sido descritas, como o *Follistatin-Related Gene*, FLRG (também chamado de *follistatin like-3*) e a SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*, também conhecida como osteonectina). Entretanto, o FLRG é a que apresenta maior homologia e semelhança funcional com a folistatina (Schneyer et al., 2001; Wang et al., 2003). Embora o FLRG se ligue à ativina da mesma forma que a folistatina, tem padrão de expressão distinto, sendo abundante na placenta, nos testículos, na pele e nos tecidos cardiovasculares, enquanto a expressão de folistatina é maior na hipófise e nos ovários. No endométrio, a produção de FLRG parece ser coordenada pelos esteróides sexuais, havendo um estímulo à sua produção por células estromais sob efeito de estradiol e progesterona, enquanto, durante a fase proliferativa, o FLRG é observado somente em células endometriais epiteliais (Wang et al., 2003).

1.3 Inibinas

Além de atuar na hipófise, inibindo a secreção de FSH, e desta forma participando do controle hormonal do ciclo menstrual, a inibina é um antagonista de ativina em muitos outros tecidos. Uma vez que nenhum receptor de inibina foi identificado até o momento, sua ação parece ser decorrente de interação com o ActRII. De fato, a inibina é capaz de ligar-se ao receptor tipo II da ativina, sem, entretanto, disparar a cascata de eventos intracelulares que resultam no efeito final da ativina (Welt et al., 2002) (Fig. 3). No entanto, o modelo de inibição competitiva não explica satisfatoriamente a ação da inibina, porque sua afinidade pelo ActRII é muito baixa, se comparada àquela da ativina (Gray et al., 2001).

A descoberta de proteínas ligadoras de inibina, inicialmente estudadas como potenciais receptores, tornou possível o entendimento do mecanismo pelo qual a inibina é capaz de antagonizar as ações da ativina: a proteína ligadora de inibina (INhBP/p120 – *Inhibin binding protein/p120*, que se liga à inibina B) e o betaglicano (que se liga à inibina A) parecem aumentar a afinidade da inibina pelo ActRII, possibilitando o mecanismo de inibição competitiva. O betaglicano, anteriormente chamado de receptor tipo III do TGF β , é produzido nas mesmas células endometriais que produzem os receptores de ativina/inibina e as subunidades da inibina. Sua produção aumenta consideravelmente na decídua da gravidez inicial (Bernard et al., 2001; Gray et al., 2001).

O betaglicano age como um co-receptor e, através de ligação de alta afinidade com a inibina, forma um complexo inativo com o receptor tipo II da ativina (ActRII ou ActRIIB). Assim, o receptor fica seqüestrado nesse complexo e impedido de se ligar à ativina (Fig. 3) (Bernard et al., 2001; Gray et al., 2001).

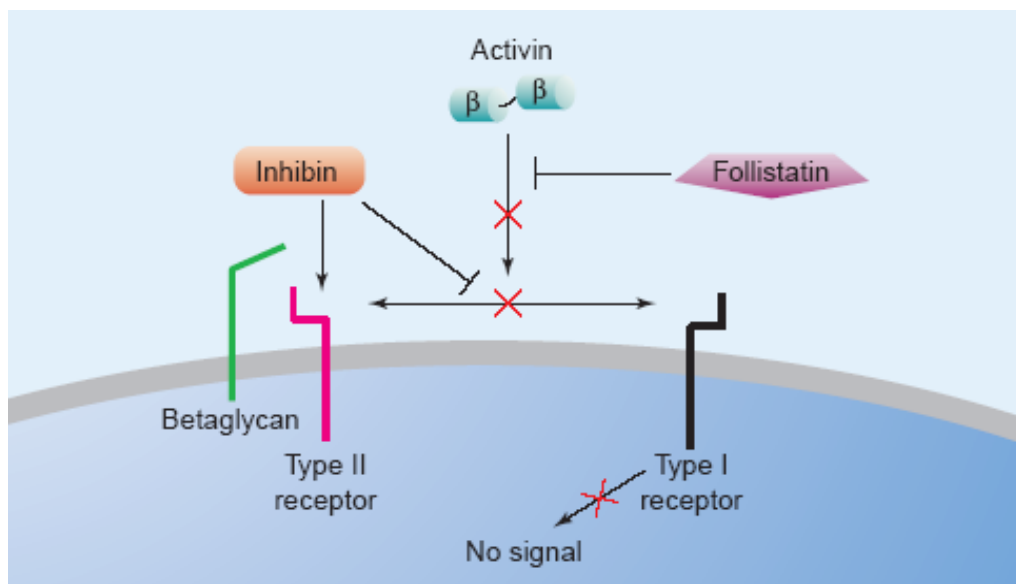


Figura 3 – Representação do mecanismo de ação da folistatina e da inibina no antagonismo da ativina [extraída de Ethier JF and Findlay JK, *Reproduction* (2001), 121: 667-675].

2. ENDOMETRIOSE

2.1 Conceito, manifestações e epidemiologia

A endometriose é uma doença caracterizada pela presença de implantes ectópicos de glândulas endometriais e/ou estroma. É uma moléstia com potencial de complicações graves e repercussões importantes, além de se configurar num desafio aos médicos e pesquisadores.

Sua manifestação clínica é geralmente progressiva. Estima-se que entre 3 e 10% das mulheres férteis em idade reprodutiva e cerca de 20 a 40% das mulheres inférteis tenham endometriose. As duas principais manifestações da endometriose são a dor pélvica e a infertilidade (Murphy, 2002; Speroff e Fritz, 2005; Speroff et al., 1999).

A dor geralmente é referida como dismenorréia e dispareunia, de caráter progressivo e com início após alguns anos de ciclos e coitos livres de dor. Embora algumas mulheres com endometriose sejam assintomáticas, a dor pode ser difusa ou localizada e pode ainda advir do envolvimento retal, vesical ou ureteral. Entretanto, a correlação entre a intensidade da dor e o grau de acometimento pélvico e/ou estadiamento da doença é pobre (ASRM, 2006b). O tratamento cirúrgico pode levar à melhora dos sintomas, mas as taxas de recorrência aumentam com o tempo após a cirurgia, chegando a atingir cerca de 40% com cinco anos (ASRM, 2006b).

Mulheres portadoras de endometriose tendem a apresentar taxas de fecundidade mais baixas que as da população geral. Este comprometimento da fertilidade, óbvio nos casos em que há aderências e alterações estruturais da pelve, pode ocorrer mesmo nos casos de endometriose mínima. Acredita-se que a endometriose esteja envolvida na etiologia da infertilidade por afetar a função tubária, a qualidade dos gametas e a receptividade endometrial. De fato, o diagnóstico de endometriose à laparoscopia é muito mais freqüente em pacientes inférteis que em pacientes férteis (ASRM, 2006a; Speroff e Fritz, 2005; Speroff et al., 1999).

As controvérsias acerca das classificações e do estadiamento da doença são grandes, devido à heterogeneidade da morfologia e à localização das lesões, aliadas à diversidade de manifestações clínicas (Brosens e Brosens, 2000b). Os estudos tendem a considerar endometriose pélvica, ovariana e do septo retovaginal como entidades diferentes (Nisolle e Donnez, 1997). Recentemente, uma classificação baseada no padrão histológico das lesões foi proposta, apresentando correlação com a localização das lesões, a presença de sintomatologia dolorosa e o prognóstico reprodutivo (Abrao et al., 2003).

2.2 Histórico e teorias

As lesões peritoneais que hoje reconhecemos como endometriose foram primeiramente descritas no século XVIII. Diversos pesquisadores, como Rokitansky em 1860, Russel, von Herff, Cullen, Meyer e Jong, deram

importantes contribuições na descrição das lesões pélvicas que continham elementos glandulares semelhantes à mucosa do útero. Os trabalhos destes e de outros autores deram origem a uma série de teorias para explicar a patogênese da endometriose: a metaplasia celômica, a persistência de células embrionárias, a disseminação hematogênica e linfática e o transplante de tecido endometrial. Embora nenhuma teoria isoladamente possa explicar todos os casos de lesões endometrióticas nas diferentes localizações (Brosens e Brosens, 2000a; Gazvani e Templeton, 2002), atualmente acredita-se que mecanismos propostos por cada uma delas possam estar envolvidos no surgimento dos diferentes tipos de lesão encontrados na clínica.

A metaplasia celômica foi a primeira teoria proposta para a patogênese da endometriose. O epitélio celômico, que origina as células dos ductos de Müller e também os epitélios pleural e peritoneal, poderia, sob ação de um fator indutor de metaplasia, originar focos de endometriose. Esta teoria é capaz de explicar a ocorrência de endometriose em quase todos os sítios distantes e os raros casos em mulheres sem útero e homens, porém, falta-lhe confirmação científica (Gazvani e Templeton, 2002).

Remanescentes de células embrionárias também foram propostos como causadores de endometriose, com base na idéia de que, em áreas adjacentes aos ductos de Müller, duplicações rudimentares do sistema mülleriano podem existir, sendo capazes de originar endométrio funcionante. Entretanto, estes remanescentes celulares incidentais não foram identificados na pelve ou no

tórax, tornando esta teoria improvável (Gazvani e Templeton, 2002; Murphy, 2002).

A disseminação de células endometriais por via linfática ou hematogênica é, há longo tempo, considerada plausível e é capaz de explicar a existência de focos extra-pélvicos e mesmo ovarianos (Gazvani e Templeton, 2002; Speroff e Fritz, 2005; Speroff et al., 1999).

A teoria do transplante de tecido endometrial foi proposta por Sampson em 1927, que introduziu o termo endometriose e propôs o fluxo retrógrado de tecido endometrial pelas trompas de Falópio, para dentro da cavidade abdominal, como fator causal inicial da doença (Brosens e Brosens, 2000a; Gazvani e Templeton, 2002; Sampson, 1927).

A teoria do transplante de tecido endometrial prevalece como a hipótese mais aceita para explicar a etiopatogenia da endometriose pélvica, suportada por vários estudos que, além de confirmar com a laparoscopia a existência de fluxo menstrual retrógrado através das fímbrias em quase todas as mulheres, fornecem outras evidências favoráveis a este modelo (Brosens e Brosens, 2000a; Gazvani e Templeton, 2002; Speroff e Fritz, 2005; Speroff et al., 1999).

2.3 Mecanismos etiopatogênicos

Entretanto, surge a seguinte questão: por que, então, apenas 3 a 10 % das mulheres têm endometriose, e não a maioria, visto que o fluxo de sangue pelas trompas no período menstrual é encontrado em cerca de 90% das mulheres? Várias explicações são propostas. Primeiramente, a quantidade de células endometriais que refluem para a cavidade peritoneal parece ser maior em pacientes com endometriose, conceito originado dos estudos com mulheres com obstrução ao fluxo menstrual, que têm incidência aumentada de endometriose (Brosens e Brosens, 2000a; Gazvani e Templeton, 2002; Murphy, 2002; Speroff e Fritz, 2005; Speroff et al., 1999).

Fatores menstruais têm sido implicados também na patogênese da doença (ciclos curtos, fluxo aumentado, nuliparidade), além do que a ciclicidade hormonal parece ter papel fundamental, porquanto é de conhecimento geral que a endometriose é rara após a menopausa e que a gravidez tem efeito benéfico em pacientes portadoras de endometriose (Gazvani e Templeton, 2002).

Alterações na produção e na ação dos esteróides sexuais têm grande importância na fisiopatologia da endometriose, doença conhecidamente dependente de estrogênio. Contudo, recentemente, os estudos apontam também alterações na resposta endometrial à progesterona, na síntese e no metabolismo do estrogênio. Já foi descrita uma diminuição da expressão de receptores tipo B da progesterona (PRB), com predomínio do tipo A (PRA) no endométrio de mulheres com endometriose. Esta forma truncada do receptor de

progesterona é, na verdade, um repressor do PRB, que é um ativador dos genes-alvo da progesterona (Attia et al., 2000). Tal alteração na expressão dos receptores de progesterona seria a base da resistência à ação desse hormônio no endométrio de mulheres com endometriose (Osteen et al., 2005).

Além disto, células endometrióticas e o endométrio de mulheres com endometriose expressam aromatase, enzima envolvida na síntese de estradiol (Dheenadayalu et al., 2002). Outros estudos mostraram uma expressão reduzida da 17-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2, no tecido endometriótico, enzima responsável pela conversão do estradiol em estrona (Zeitoun et al., 1998). Este achado, contudo, não foi confirmado por estudo posterior, que encontrou, na verdade, aumento da expressão desta enzima no tecido endometriótico obtido de lesões peritoneais e de endometriomas (Carneiro et al., 2007). Embora haja ainda alguma controvérsia nos mecanismos moleculares, estas alterações seriam suficientes para gerar um ambiente altamente estrogênico, e a deficiência de receptores de progesterona ocasionaria uma resistência à ação deste hormônio no endométrio de pacientes com a doença, configurando assim alterações hormonais locais importantes na manutenção dos implantes (Giudice e Kao, 2004).

Há ainda, possivelmente, fatores genéticos envolvidos na patogenia da endometriose, haja vista a alta concordância descrita em gêmeas monozigóticas e a prevalência de endometriose, 6 a 7 vezes mais alta em parentes de primeiro grau de mulheres afetadas que na população geral (Speroff e Fritz, 2005).

Mediadores inflamatórios também contribuem, senão na patogênese, na fisiopatologia da doença. Há evidências claras de que a função imunológica de pacientes com endometriose difere da de mulheres saudáveis.

Estudos têm mostrado alterações na resposta humoral por alterações nos linfócitos B e na produção de citocinas. Elevações nas concentrações peritoneais de interleucinas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) têm sido relatadas em pacientes com endometriose e sugeridas como potencialmente envolvidas na fisiopatologia da doença (Oral et al., 1996). Elevações nas concentrações peritoneais de TNF- α e séricas de IL-6 são bem documentadas e estas citocinas foram propostas como possíveis marcadores com aplicação diagnóstica, uma vez que o marcador convencional, CA125, um antígeno expresso por células endometriais, apresenta problemas com sensibilidade e especificidade (Bedaiwy e Falcone, 2004; Bedaiwy et al., 2002). Quanto à resposta celular, há uma diminuição da citotoxicidade mediada por linfócitos T, incluindo diminuição da atividade de células *natural killer* (NK) no líquido peritoneal de mulheres com endometriose (Gazvani e Templeton, 2002; Oral et al., 1996).

Nesta complexa rede de influências hormonais, genéticas e imunológicas, diversos fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão celular têm sido exaustivamente estudados, abrindo enorme campo de pesquisa sobre a doença e realçando o importante papel dos mecanismos de comunicação celular. O estudo dos diversos mediadores possivelmente envolvidos na gênese e na fisiopatologia da endometriose pode ser uma

importante ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e prevenção da formação de novas lesões, levando a importantes repercussões na clínica ginecológica.

De acordo com o mecanismo proposto na teoria de Sampson, para que se estabeleça uma lesão endometriótica a partir das células descamadas do endométrio menstrual, estas devem apresentar capacidade de adesão, migração e invasão. Uma vez implantadas no peritônio, proliferação e vascularização tornam-se pontos cruciais para a sobrevivência do implante endometriótico. Diferenças na capacidade de adesão, invasão e sobrevivência das células endometriais podem ser determinantes da presença ou não da doença (Giudice e Kao, 2004; Sampson, 1927).

Estudos publicados nas últimas duas décadas têm procurado esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na interação endométrio-peritônio, ou seja, nos processos de adesão e invasão do peritônio pelo foco endometriótico.

Inicialmente, os trabalhos mostravam que o endométrio menstrual era capaz de aderir ao âmnio, utilizado como substituto do peritônio, somente em locais em que o mesotélio estava ausente ou danificado (Groothuis et al., 1998). A idéia da necessidade de uma solução de continuidade no mesotélio peritoneal para que as células endometriais pudessem aderir foi contestada pela comprovação da adesão de células endometriais estromais e epiteliais ao mesotélio íntegro (Witz et al., 1999; Witz et al., 2001).

Estudos subseqüentes mostraram então que, num período de 18 a 24 horas, já se podia observar a invasão transmesotelial das células estromais e

epiteliais em explantes de peritônio e culturas de células mesoteliais *in vitro* (Witz et al., 2003; Witz et al., 2002c).

Moléculas de adesão presentes na superfície das células endometriais e mesoteliais vêm, então, sendo estudadas nos fenômenos de adesão e invasão, utilizando modelos de peritônio *in vitro* (Lucidi et al., 2005a; Lucidi et al., 2005b; Witz et al., 2002a; Witz et al., 2003; Witz et al., 2002c; Witz et al., 1999; Witz et al., 2001). Uma dessas moléculas é o CD44, ligante do ácido hialurônico, presente na superfície do mesotélio peritoneal, que mostrou participar no processo de adesão das células endometriais, pois o tratamento do mesotélio com hialuronidase diminuiu significativamente a taxa de adesão das células endometriais (Dechaud et al., 2001). Diferentemente, as integrinas $\alpha_2\beta_1$ $\alpha_3\beta_1$, que se pensou estarem envolvidas no fenômeno de adesão, quando neutralizadas por anticorpos específicos, não provocaram nenhum decréscimo na taxa de adesão (Witz et al., 2002b; Witz et al., 1998; Witz et al., 2000).

Além dessas, as caderinas, moléculas de adesão dependentes de cálcio, responsáveis por ligação homofílica, têm sido estudadas em doenças envolvendo adesão, migração e invasão, como cânceres e endometriose. Trata-se de uma família de proteínas distintas, cujo domínio intracelular liga-se às cateninas, que estabelecem a conexão entre as caderinas e o citoesqueleto, e que estão também envolvidas na regulação transcricional.

As caderinas E e N são os membros mais bem caracterizados do subgrupo denominado de caderinas clássicas. A caderina E é uma glicoproteína de 120 kDa, encontrada em células epiteliais. Já a caderina N é uma proteína

de 135 kDa, expressa em tecidos de origem neuroectodérmica e mesodérmica (Peralta Soler et al., 1997). Entretanto, estudos posteriores observaram a presença destas caderinas em outros tecidos e tipos celulares. De fato, ambas as glicoproteínas são expressas no endométrio humano normal: caderina E, durante todo o ciclo, e caderina N, principalmente na fase proliferativa (Poncelet et al., 2002; Tsuchiya et al., 2006).

Evidências recentes apontam para a perda da expressão de caderina E (*epitelial*) como responsável parcialmente pelas capacidades de invasão e metástases, fenômenos comuns na progressão de cânceres, fato que a levou a ser considerada um gene supressor de tumor (Leblanc et al., 2001).

Além disso, uma “troca” de caderina E para caderina N tem sido observada em alguns carcinomas. Acredita-se que a caderina N pode conferir um comportamento invasivo à célula e prover interações com os componentes endotelial e estromal (Witz, 2005; Yoshinaga et al., 2004).

Há relatos também de diminuição da expressão de ambas as caderinas E e N no adenocarcinoma endometrial (Leblanc et al., 2001). A menor expressão de caderina E nestes carcinomas está relacionada a maior invasão miometrial e mortalidade pelo câncer aumentada (Mell et al., 2004).

Acredita-se que células endometrióticas e cancerosas compartilhem mecanismos moleculares de invasão e metástases, envolvendo a expressão de caderinas (Starzinski-Powitz et al., 1999). De fato, vários estudos têm investigado o papel das caderinas na endometriose, sendo que proporções aumentadas de células positivas para caderina N foram encontradas em

endometriomas, em comparação com carcinoma ovariano, e proporções maiores de células negativas para caderina E, em comparação com cistadenomas ovarianos (Darai et al., 1998).

A expressão de caderina E no tecido endometriótico é menor, se comparada ao endométrio eutópico (Poncelet et al., 2002). Os estudos sugerem haver uma gradação decrescente na expressão de caderina E entre endométrio de mulheres sem endometriose, endométrio eutópico de pacientes com endometriose e tecido de lesão endometriótica (Scotti et al., 2000).

Contraditoriamente, porém, outros pesquisadores encontraram expressão semelhante de caderinas E e N em endometriomas e endométrio eutópico de pacientes com endometriose (Chen et al., 2002).

Ainda corroborando a importância dos fenômenos de invasão e remodelação tecidual na gênese da lesão endometriótica, as metaloproteinases (MMPs) também têm sido alvo de vários estudos. Sua função primordial, a digestão das proteínas da matriz extracelular, é parte imprescindível do processo de formação do implante.

Estas enzimas, presentes no endométrio normal, vêm sendo encontradas em níveis aumentados na endometriose. De fato, a MMP-9 é expressa em níveis elevados no tecido endometrial eutópico de mulheres com endometriose, assim como a relação desta com seu principal inibidor, TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*), a relação MMP-9/TIMP-1, denotando aumento da atividade desta enzima (Collette et al., 2006). Outro estudo mostrou expressão aumentada de mRNA de MMP-9 no implante

endometriótico, comparado ao endométrio eutópico, juntamente com diminuição da expressão de TIMP-3 (Chung et al., 2001). Além disto, um estudo em mulheres com endometriomas mostrou que a concentração sérica de MMP-9 diminuiu após cirurgia para remoção do endometrioma (Abdallah et al., 2006).

Outros estudos mostram que células endometriais de pacientes com endometriose apresentam menor sensibilidade à progesterona, não exibindo diminuição significativa da expressão de MMP-3 e MMP-7, como acontece em células endometriais de mulheres sem endometriose (Bruner-Tran et al., 2006). A inibição da atividade de metaloproteinases parece diminuir a formação de lesões endometrióticas em modelos experimentais (Bruner-Tran et al., 2006; Nap et al., 2004).

Durante o ciclo menstrual, a expressão das MMPs pelo endométrio é regulada pelos esteróides ovarianos, envolvendo também mediadores parácrinos como TGF- β e citocinas. Sua atividade é inibida pela progesterona durante a fase secretora. A resistência à ação da progesterona no endométrio de mulheres com endometriose pode, de fato, ter importância crucial na expressão destas enzimas, promovendo a formação dos implantes endometrióticos (Osteen et al., 2005).

3. ATIVINA A, ENDOMÉTRIO E ENDOMETRIOSE

Ativina A é produzida tanto pelo endométrio normal quanto pelas células das lesões endometrióticas. No endométrio, ativina tem sido implicada no fenômeno da decidualização e tem expressão variável ao longo do ciclo (Florio et al., 2003; Jones et al., 2006b; Jones et al., 2000; Jones et al., 2002a; Mylonas et al., 2004; Otani et al., 1998).

As subunidades α , βA e βB foram detectadas através de imunohistoquímica, principalmente nas células epiteliais glandulares e de superfície durante a fase proliferativa. Na fase secretora tardia e no primeiro trimestre da gravidez, a expressão das três subunidades torna-se marcante nas células endometriais estromais e mantém-se nas células epiteliais, à exceção da subunidade α , que sofre um decréscimo importante com a decidualização, chegando a uma expressão quase nula no primeiro trimestre da gravidez. A maior expressão do mRNA da subunidade βA favorece a produção de dímeros de ativina A na fase secretora (Jones et al., 2000; Petraglia et al., 1998).

Os achados relativos à produção de ativina e inibina pelo endométrio da fase secretora e do primeiro trimestre da gravidez são consistentes com aqueles verificados em pacientes usando contracepção com progestagênios isolados (implantes subdérmicos e sistema intra-uterino liberador de levonorgestrel). Isto, somado às modificações quantitativas e qualitativas na expressão endometrial das subunidades da inibina que se seguem à elevação da progesterona na fase secretora, implica um presumível papel regulatório da

progesterona. Aparentemente, a progesterona estimula a produção de ativina A nas células endometriais e esta, por uma ação parácrina, promove a decidualização de células estromais vizinhas (Jones et al., 2000). De fato, a adição de ativina A a células estromais *in vitro* tratadas com estrógeno e progesterona estimula o fenômeno de decidualização, provocando um aumento na produção de prolactina no meio de cultura e as alterações morfológicas características. A adição de folistatina ao meio de cultura reverte o efeito da ativina na produção de prolactina (Jones et al., 2002a).

Além de promover a decidualização, a ativina A parece ter outras funções importantes na implantação e invasão da decídua pelo trofoblasto. A ativina A promove a diferenciação das células do citotrofoblasto, tornando-as mais invasivas, com aumento da produção de marcadores de diferenciação e invasividade, como integrina $\alpha 5\beta 1$, fibronectina e MMP-2 (Caniggia et al., 1997).

A ativina A, produzida essencialmente pelas células endometriais epiteliais e estromais decidualizadas, estimula também a produção *in vitro* de MMPs 2 e 3 pelas células endometriais estromais e das MMPs 2, 3, 7, 9 e MMP-2 ativa pelas células epiteliais, efeitos revertidos pela adição de inibina A (Jones et al., 2006a). Estas enzimas participam não só de processos fisiológicos de remodelação endometrial (decidualização, implantação, menstruação e reestruturação cíclica do endométrio), mas são também implicadas em processos de invasão, como ocorre em neoplasias e metástases. Seu

envolvimento na endometriose se relaciona ao potencial de invasão do peritônio pelas células endometriais, após a adesão inicial ao mesotélio peritoneal.

O estímulo à produção de MMPs pode ser um dos mecanismos pelos quais a ativina vem sendo implicada em doenças como câncer e endometriose. De fato, as concentrações séricas de ativina A estão aumentadas no adenocarcinoma endometrial e no câncer cervical, e decrescem logo após a cirurgia para retirada do tumor (Petraglia et al., 1998). Da mesma forma, a expressão da subunidade β A mostrou-se aumentada à imunohistoquímica em amostras de adenocarcinoma endometrial comparadas a amostras de endométrio normal (Otani et al., 2001).

Em outros tumores, a ativina A também tem sido relacionada a comportamento invasivo. A ativina A promove aumento na expressão de caderina N em linhagens celulares de câncer de esôfago. A expressão desta molécula nos tumores mostrou-se relacionada à invasão em profundidade e a um pior prognóstico para os pacientes portadores deste tipo de câncer (Yoshinaga et al., 2004; Yoshinaga et al., 2003).

Altas concentrações de ativina A, inibina A e inibina B foram encontradas no líquido peritoneal em pacientes inférteis com endometriose. Nas pacientes com endometriose, a concentração peritoneal destas substâncias foi semelhante à encontrada em mulheres sem a doença, sendo, entretanto, muito superior à concentração sanguínea. Verificou-se que tanto o peritônio das mulheres saudáveis quanto as células endometrióticas extraídas de focos pélvicos nas mulheres acometidas expressaram mRNA específico para

subunidade α , βA e βB de inibina/ativina e para os receptores tipo II da ativina, ActRIIA e ActRIIB (Florio et al., 1998).

Evidências apontam para a existência de produção local de inibina A e ativina A em pacientes com endometriose ovariana, pois concentrações das subunidades α e βA nas lesões endometrióticas são superiores às concentrações peritoneais e cinco vezes maiores que as sangüíneas. A presença das subunidades α e βA nas células epiteliais e estromais dos cistos endometrióticos e dos focos ileais de endometriose foi demonstrada por meio de imunohistoquímica. Interessantemente, as células estromais de cistos endometrióticos expressaram menores quantidades da subunidade βA que as células estromais endometriais em fase proliferativa (Reis et al., 2001).

Outros estudos encontraram maior expressão da subunidade βA em células glandulares do endométrio de mulheres com endometriose graus I e II, em relação ao mesmo tipo celular do endométrio de mulheres sem endometriose. Já nas células estromais e leucócitos endometriais, a expressão de βB se mostrou maior nas mulheres acometidas do que mulheres saudáveis. Além disso, em cultura, as células endometrióticas, endometriais epiteliais e estromais provenientes de mulheres com endometriose produzem mais ativina A que as mesmas células provenientes de mulheres sem a doença (Rombauts et al., 2006).

Além disto, estudos recentes mostram uma desregulação na expressão de antagonistas de ativina nas lesões endometrióticas, com aumento da

expressão de folistatina e diminuição de FLRG, reforçando o envolvimento deste sistema na fisiopatologia da endometriose (Torres et al., 2007).

Desse modo, sendo produzida no endométrio e nas lesões endometrióticas, encontrando em células mesoteliais e endometriais receptores prontos a desencadear a cascata de eventos intracelulares, e estando implicada na expressão de moléculas envolvidas em processos de adesão e invasão celular, nossa hipótese é que ativina teria efeito promotor na gênese da lesão endometriótica.

O estudo do envolvimento do sistema ativina-inibina-folistatina na fisiopatologia da endometriose pode resultar, no futuro, não só em um melhor entendimento dos mecanismos de estabelecimento da doença, como também em potenciais avanços no seu diagnóstico e tratamento.

2. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é avaliar o papel da ativina A na patogênese da lesão endometriótica através de modelos *in vitro*, estudando seus efeitos nos fenômenos de adesão e invasão peritoneal pelas células endometriais.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da ativina A na taxa de invasão transmesotelial de células endometriais num modelo *in vitro*;
- Verificar se ativina A é capaz de promover aumento na taxa de adesão de células endometriais às células mesoteliais peritoneais;
- Verificar se ativina A é capaz de promover aumento na taxa de proliferação de células endometriais;
- Comprovar se a inibina A e a folistatina são capazes de, separadamente, antagonizar os efeitos da ativina A;
- Avaliar a expressão dos receptores de ativina (ActRIIB, ActRIA) nas células mesoteliais e endometriais, através de imunocitoquímica;
- Verificar se o tratamento das células endometriais com ativina A, isoladamente ou em combinação com inibina A ou folistatina, promove alteração na expressão celular do mRNA para caderinas E e N.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CULTURA DE CÉLULAS

1.1 Cultura de Células Mesoteliais

Células mesoteliais estabelecidas LP9, obtidas do *National Institutes of Health Aging Cell Repository* (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA), foram cultivadas em meio composto de *MCDB 131/ Medium 199* (Sigma) suplementado com fator de crescimento epitelial (EGF, 20 ng/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), L-glutamina 2mM (Gibco, Grand Island, NJ, USA), hidrocortisona 400 ng/ml, antibiótico/antimicótico 1% (Gibco), tampão HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico] (Mediatech) e soro bovino fetal (SBF) 10%. Amostras eram congeladas para estoque e repicadas sucessivamente até a 10^a passagem no laboratório, após a aquisição do banco de células (P=n+10). Estudos conduzidos anteriormente no laboratório mostraram que a monocamada de LP9s se constitui num bom substituto para o explante de peritônio (Lucidi et al., 2005a).

Quando a monocamada se tornava confluenta, as células eram repicadas e plaqueadas em placa de 96 poços tratada para cultura de tecidos (BD Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), numa contagem inicial de 3.500 células por poço, onde eram incubadas a 37° C por 3 a 4 dias até a confluência. Essas placas eram posteriormente usadas no ensaio de adesão.

Para o ensaio de invasão, as LP9s eram plaqueadas em câmaras de invasão com poros de 8.0 µm cobertas por *Growth Factor-Reduced Matrigel* (BD

Bio Coat, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) numa concentração de 20.000 células por câmara, em 500 µL. As câmaras de invasão eram colocadas então em uma placa de 24 poços e continham, no seu interior, a suspensão celular e, no seu lado externo (interior dos poços), 500 µL de meio de cultura para células mesoteliais. Assim eram incubadas por 48 horas a 37°C, para atingirem confluência.

1.2 Cultura de Células Endometriais

Células endometriais epiteliais e estromais foram obtidas do banco de células do laboratório de cultura celular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da *Medical School of the University of Texas Health Science Center at San Antonio*. Essas células eram congeladas após a primeira ou segunda passagem para uso posterior em experimentos, sendo todas derivadas de biópsias endometriais (n= 15) realizadas em fase proliferativa do ciclo menstrual de pacientes não portadoras de endometriose em investigação para infertilidade, ou durante cirurgias para prolapso uterino ou miomatose. Pacientes que haviam feito uso de tratamento hormonal nos 3 meses anteriores à coleta do endométrio eram excluídas do estudo.

As alíquotas celulares mantidas em nitrogênio líquido em 1 ml de meio de cultura com dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, eram descongeladas e plaqueadas em frascos de 75 cm², com 10 ml do respectivo meio de cultura. O meio era trocado após incubação *overnight* e, daí em diante, as células eram

cultivadas até atingirem confluência, tendo o meio trocado a cada 2 ou 3 dias. Ao atingirem a confluência, as células eram repicadas e plaqueadas em vários frascos de 25 cm², para os diversos tratamentos, e deixadas crescerem até atingirem o estado de subconfluência.

O processamento inicial das biópsias foi realizado como descrito a seguir:

Endométrio em fase proliferativa foi obtido imediatamente após histerectomia ou por biópsia aspirativa com Pipelle (Unimar Inc., Prodimed, Neuilly-en-Thelle, France), durante cirurgias para condições benignas em mulheres sem endometriose. O endométrio era transportado ao laboratório em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma, St. Louis, MO) acrescido de SBF 10% (HyClone, Logan, UT).

O endométrio foi inicialmente seccionado em pequenos fragmentos com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Em seguida, realizou-se digestão enzimática com colagenase tipo 1 a 0,1% (Worthington Biomedical, Freehold, NJ) e DNAase 0,5% (Sigma). As células endometriais epiteliais eram assim separadas das células estromais por sedimentação pela gravidade. O sobrenadante rico em células estromais era colocado em frascos de cultura e deixado por 20 minutos, para que ocorresse a aderência das células. As células estromais aderentes eram cultivadas em monocamadas em frascos com DMEM/F-12 (1:1) (GIBCO, Invitrogen, CA, USA) contendo antibióticos/antimicóticos, insulina (Sigma) e SBF 10%.

O pellet rico em células epiteliais era ressuspendido e mantido em frascos por 20 minutos. O sobrenadante não-aderente rico em células epiteliais era recuperado e colocado em um novo recipiente. As células endometriais epiteliais eram então cultivadas como monocamadas em *Minimum Essential Medium* (MEM, JRH Biosciences, Lenexa, KS) contendo antibiótico/antimicótico, 10 µg/ml de insulina, 0,3µg/ml de D-glicose (Sigma) e SBF 10%.

Após a segunda passagem, uma amostra das células epiteliais e estromais foi colocada em câmaras de microscopia. A pureza das culturas foi demonstrada morfológicamente pela coloração de hematoxilina-eosina e imunohistoquimicamente por incubação com anticorpos monoclonais para citoqueratina humana (Oncogene Science, Uniondale, NY, USA), vimentina (Oncogene Science), CD45 (The Binding Site, San Diego, CA, USA) e fator de Von Willebrand (Dako, Carpinteria, CA, USA). Usando estas técnicas, estudos prévios têm mostrado pureza superior a 97% para células endometriais epiteliais e estromais (Irwin et al., 1989; Witz et al., 2002b).

2. TRATAMENTOS

24 horas antes dos ensaios, o meio de cultura das células endometriais era trocado por meio composto por DMEM/F-12 e *heat inactivated charcoal stripped fetal calf serum* (csFCS, Trace Biosciences) a 10%, no grupo controle. Para os demais grupos, este meio era suplementado com ativina A, inibina A ou folistatina, conforme descrito a seguir.

2.1 Ativina A

As células endometriais estromais (n= 6 culturas) e epiteliais (n=5 culturas) foram incubadas, acrescidas ou não de ativina A (Recombinant Human Activin A, 338-AC-005, R&D Systems, MN, USA) em concentrações crescentes de 6,25 ng/ml até 50 ng/ml, por 24 horas. Em seguida, os ensaios eram realizados como descrito anteriormente, persistindo o tratamento durante cada ensaio. A dose na qual verificamos maior intensidade de efeito foi então utilizada na etapa seguinte: comparação dos efeitos da ativina A isoladamente e em associação com seus antagonistas, inibina A e folistatina.

2.2 Antagonistas: Folistatina e da Inibina A

Nesta etapa, culturas de células endometriais epiteliais (n=10) e estromais (n=8) foram tratadas com ativina A isoladamente e associada aos antagonistas.

Para avaliar se inibina A e folistatina eram capazes de antagonizar os efeitos da ativina, essas substâncias foram adicionadas às células endometriais, juntamente com ativina A a 25 ng/ml.

Foi usada folistatina-300 (Peso Molecular = 31kDa), uma forma recombinante truncada da FS-315, em que faltam os 15 aminoácidos carboxi-terminais (Recombinant Human Follistatin 669-FO-025 R&D Systems, MN, USA) na concentração de 250 ng/ml e inibina A (DSL-R05140 Diagnostic Systems Laboratories, TX, USA) na concentração de 50 ng/ml.

A concentração de inibina A utilizada corresponde a uma concentração supramolar em relação à concentração de ativina A (1,56 nM x 0,96 nM, respectivamente). Da mesma forma, a concentração de folistatina usada corresponde, grosseiramente a cerca de 8 vezes a concentração molar inicial de ativina. Apesar do aparente excesso, tal relação folistatina / ativina encontra respaldo na literatura (Jones et al., 2002a).

3. ENSAIOS

O estudo das taxas de adesão e invasão de células endometriais a modelos de peritônio *in vitro* foi realizado através de ensaios previamente descritos (Lucidi et al., 2005a; Nair et al., 2006).

3.1 Preparo das Células Endometriais

Ao atingirem o estágio de subconfluência, as células eram incubadas por 24 horas com o tratamento apropriado.

A seguir, as células estromais e epiteliais eram coletadas usando solução de dissociação celular não-enzimática (CDS, Sigma) e lavadas com seu respectivo meio completo. O volume total obtido era dividido em alíquotas, conforme os ensaios a serem realizados (adesão, invasão e proliferação, e ainda amostras para extração de mRNA para reação em cadeia da polimerase (PCR) e confecção de lâminas de cytospin). As células de cada alíquota recebiam, a seguir, tratamento adequado a cada ensaio.

3.2 Ensaio de Invasão

A alíquota das células endometriais destinada ao ensaio de invasão era incubada em uma solução 20 μ M de *Cell Tracker*[™] *Green CMFDA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em D-PBS por 20 minutos a 37°C. A seguir, os tubos eram

centrifugados e o sobrenadante aspirado. As células eram ressuspensas em DMEM/F-12 acrescido de csFCS 10% e incubadas novamente por 30 minutos a 37°C. Logo após, as células eram contadas em câmara de Neubauer e o volume final da suspensão celular era ajustado com meio de cultura até que se obtivesse a concentração final de 50.000 células/ml.

Então, 500 µL de suspensão eram adicionados à câmara de invasão contendo uma monocamada confluyente de células mesoteliais, após retirada do meio de células mesoteliais de dentro e fora das câmaras. O lado externo da câmara (fundo de cada um dos poços da placa de 24 poços) era preenchido com 500 µL do meio de cultura adequado a cada condição em teste.

As placas eram incubadas por 24 horas, para que ocorresse invasão, e após esse intervalo, as células que não haviam invadido (no lado interno das câmaras de invasão) eram removidas com auxílio de 3 swabs de algodão. Para fixação, mergulhavam-se as câmaras de invasão em formaldeído 3%, a 4°C por no mínimo 2 horas.

Subseqüentemente, as membranas eram retiradas do formaldeído e mergulhadas em solução 1:1000 de *Hoescht® blue dye* (Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA) em D-PBS e fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon DXM 1200F com câmara digital, utilizando o software Nikon ACT1 versão 2.63 com objetiva de 20 vezes (Nikon; Melville, NY).

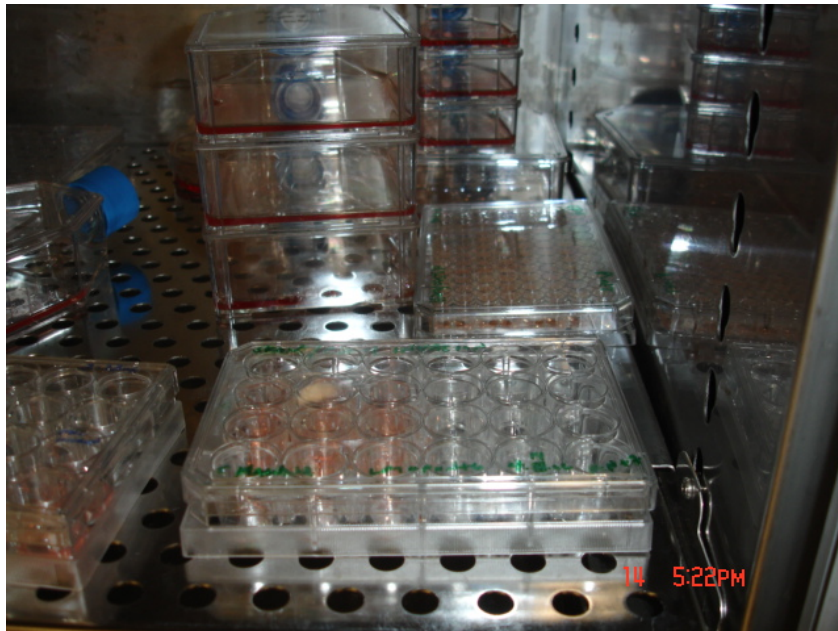


Figura 4 – Preparação dos modelos de invasão e adesão. Incubação da placa de 24 poços usada no ensaio de invasão. Ao fundo, placa de 96 poços com células mesoteliais em incubação, sendo preparadas para o ensaio de adesão.

As imagens foram gravadas em modo de cor RGB (*Red-Blue-Green*), formato JPEG (*Joint Photographic Experts Group*) em arquivos pequenos (1.028 x 1.024 pixels). A exposição era calculada de forma a oferecer a menor coloração de fundo possível, distinguindo-se as células, e era mantida para todo o experimento.

Obtinham-se 8 fotos de cada câmara de invasão, seguindo o diagrama representado na figura 5.

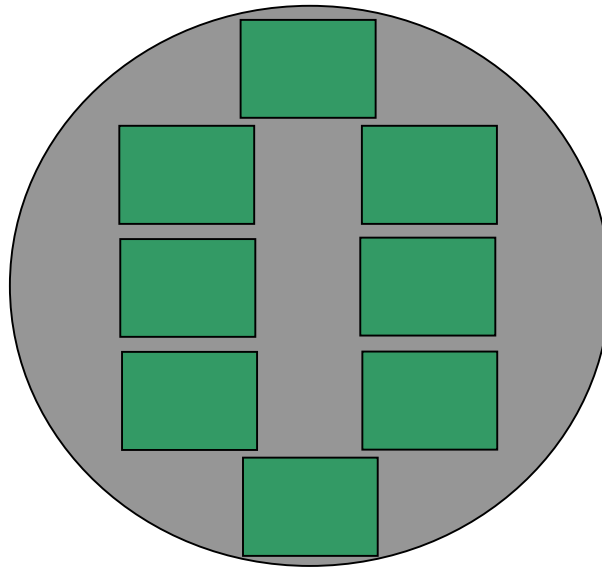


Figura 5 – Diagrama usado para fotografar câmaras de invasão na quantificação do ensaio

Eram obtidas sempre 2 fotos para cada campo, uma com o filtro para verde (*CelltrackerTM Green CMFDA*) e outra com o filtro para o azul (*Hoescht[®] blue dye*). As fotos eram posteriormente sobrepostas com o uso do software Adobe Photoshop[®] e tinham sua curva de intensidade de cor ajustada para permitir melhor contraste, possibilitando a contagem. As células eram marcadas manualmente e, a seguir, as marcas eram contadas pelo programa Corel Draw 10[®].

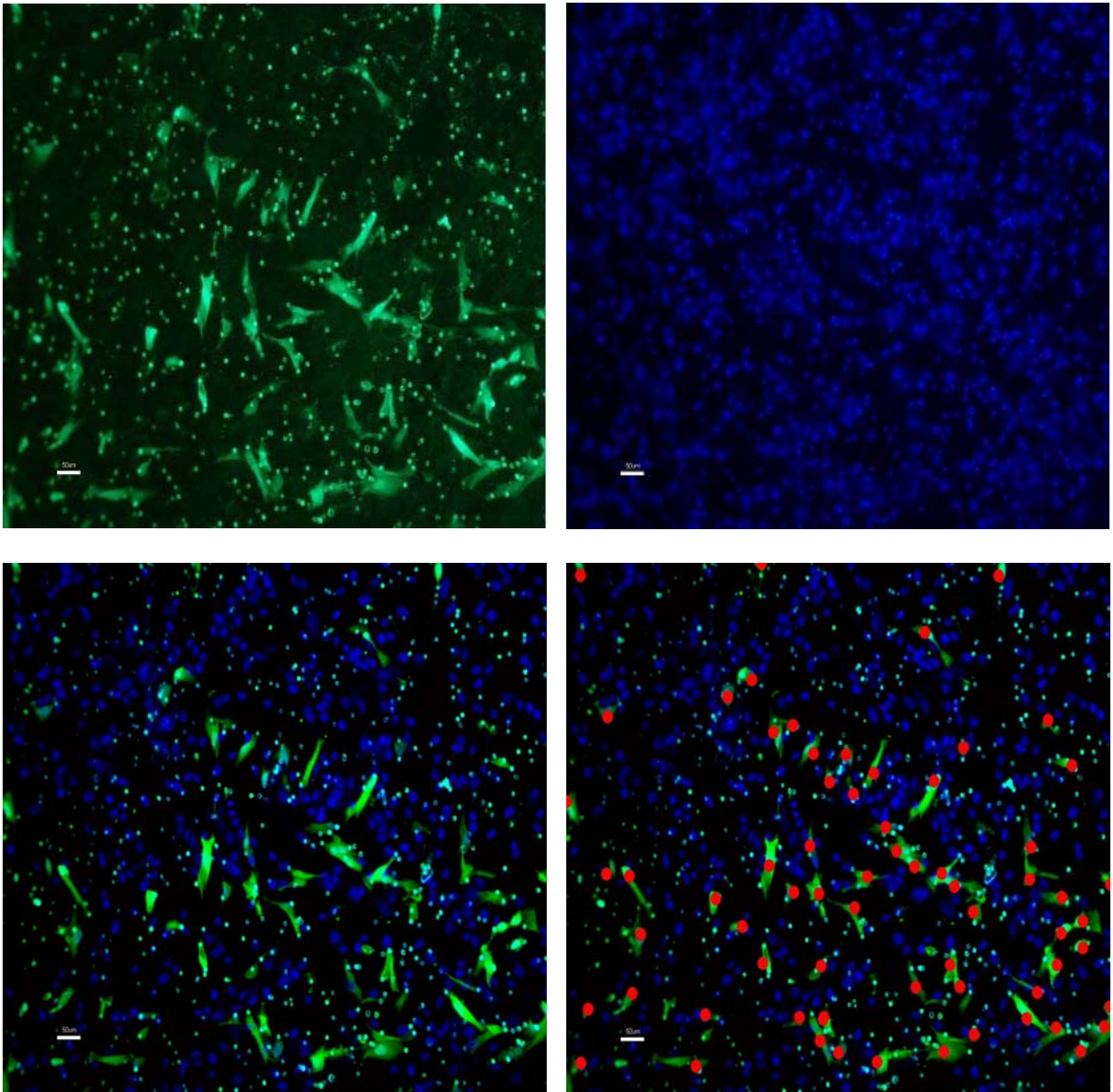


Figura 6 – Processo de contagem das células no ensaio de invasão - I: A e B) fotos obtidas com o microscópio Nikon DXM1200F, com filtros para verde (A) e azul (B); C) resultado da superposição das fotos com Adobe Photoshop, após correção do *background*; D) marcação manual das células a serem contadas

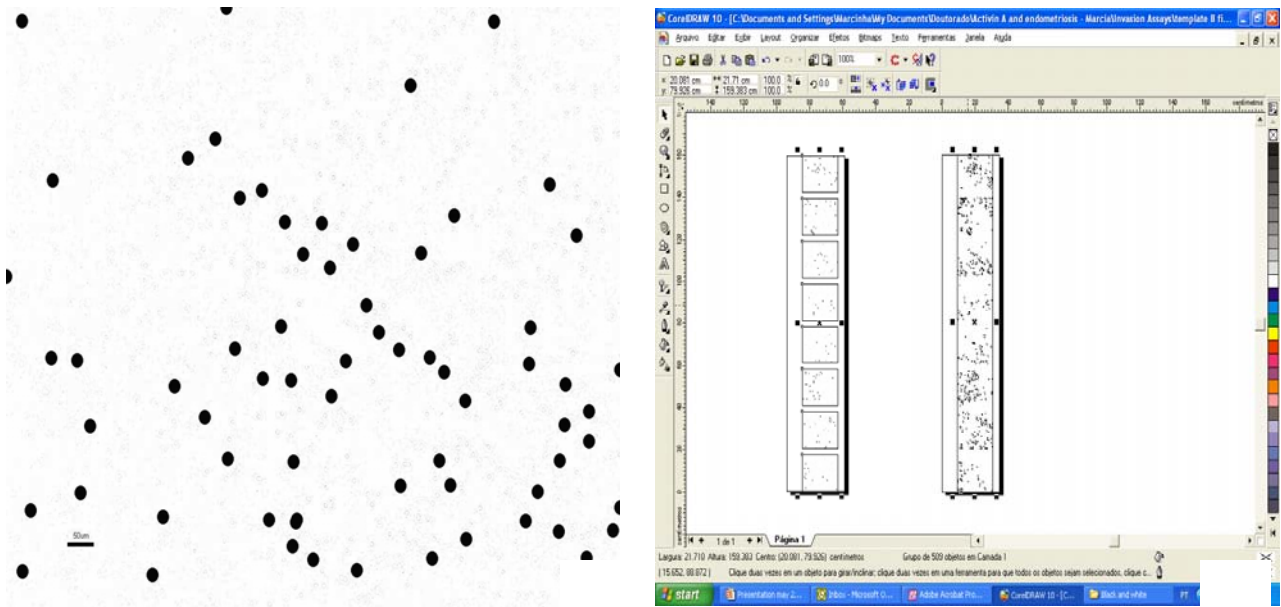


Figura 7 – Processo de contagem das células no ensaio de invasão – II: A) Resultado da conversão em preto e branco com o Adobe Photoshop; B) Conversão em Bitmap e contagem dos 8 campos de cada câmara de invasão com Corel Draw

3.3 Ensaio de Adesão às Células Mesoteliais

O pellet de células endometriais estromais (n=5 culturas) ou epiteliais (n=7 culturas) era ressuspendido em *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (D-PBS) sem cálcio ou magnésio (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo calceína fluorescente, 5 μ M (Calcein-AM, Molecular Probes™ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubado por 20 minutos a 37°. Posteriormente, os tubos eram centrifugados novamente e, removido o sobrenadante, o pellet era ressuspendido em DMEM/F-12 (GIBCO, Invitrogen, CA, USA) acrescido de csFCS 10%, contendo 1% de antibiótico/antimicótico. As células eram contadas

em câmara de Neubauer e a quantidade de meio ajustada para que se atingisse a concentração de 200.000 células/mL. Em seguida, 100 µL eram colocados em cada um dos 96 poços da placa confluenta de LP9s, após descarte do meio que se encontrava em cada poço.

Como controles positivos do experimento, células das linhagens EM42, derivada de células endometriais epiteliais que sofreram imortalização espontaneamente, e SKOV-3, derivadas de carcinoma ovariano, eram submetidas ao mesmo processo de marcação e contagem e adicionadas ao ensaio, em replicatas.

Após a adição das células endometriais estromais e epiteliais às células mesoteliais confluentes, as placas eram cultivadas a 37°C por uma hora, em atmosfera a 5% de CO₂.

Em seqüência, uma leitura da fluorescência total de cada poço era obtida, usando-se um leitor de fluorescência (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific, FL, USA) com filtros para absorção e emissão de 485 nm and 538 nm, respectivamente. A leitura obtida era diretamente proporcional ao número de células em cada poço (Lucidi et al., 2005a).

A seguir, o meio nos poços era desprezado e a placa mergulhada e invertida em num banho de D-PBS a 37°C e colocada no agitador orbital (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA, USA), calibrado para 20.000 rpm, por 20 minutos, numa atmosfera com 5% de CO₂. Durante esse período, as células não aderentes eram precipitadas pela gravidade, indo da placa para o fundo do recipiente contendo o banho. A solução de lavagem era então cuidadosamente

desprezada e cada poço era preenchido com DMEM/F-12, para nova leitura. A porcentagem de células aderidas era calculada como sendo a razão entre a segunda e a primeira leituras obtida para cada poço.

Estudos prévios mostram um coeficiente de variabilidade intra-ensaio de menos que 7%.

3.4 Ensaio de Proliferação

Células endometriais epiteliais (n=8 culturas) ou estromais (n=7 culturas) eram colocadas em uma placa de 96 poços, numa contagem de 20.000 células por poço, e tratadas por 24 horas. A seguir, a solução de MTT [brometo de 3-(4, 5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio] era adicionada aos poços, na dose recomendada pelo fabricante (ATCC, Manassas, VA USA). O MTT era então convertido a formazan, composto arroxeadado que se precipita na célula. O formazan era, solubilizado pela adição de detergentes ao ensaio, conferia a cada um dos poços tonalidade arroxeadada, de intensidade variada. A quantificação era feita através de espectrofotometria.

4. IMUNOCITOQUÍMICA

Para imunocitoquímica, células endometriais epiteliais e estromais foram cultivadas em *chamberslides* e fixadas em acetona fria. Além disto, amostras das células endometriais foram centrifugadas em Cytospin sobre lâminas de vidro, deixadas secar ao ar. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com fina camada de parafina e mantidas a 4° C até o processamento por imunocitoquímica.

Inicialmente, as lâminas foram colocadas em estufa a 60° C por 5 minutos, para remoção da cobertura de parafina. A seguir, foram mergulhadas em 2 banhos de xilol e a hidratação foi obtida com banhos de concentrações decrescentes de álcool etílico (de absoluto a 75%), de 5 minutos cada, terminando com banho de 1 minuto em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 0,3% por 10 minutos. Em seguida, era feito o bloqueio da biotina endógena com kit comercialmente disponível, conforme instruções do fabricante (DAKO Biotin Blocking System, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA).

Seguiu-se o bloqueio de ligações inespecíficas com soro eqüino (1:30). Utilizando o Kit Vectastain Elite Universal (Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA), obtivemos a coloração pela técnica da avidina-biotina-peroxidase. Os anticorpos para ActRIIA e ActRIB (gentilmente fornecidos pelo Dr. W. Vale, Salk Institute, EUA) foram aplicados em condições previamente padronizadas (incubação *overnight*, a 4°C), em diluições de 1:50 e 1:25, respectivamente,

seguidos pelo anticorpo biotilado e pelo complexo avidina-biotina-peroxidase. Como cromógeno, utilizamos 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma Chem. CO, St Louis, MO, USA).

A coloração obtida foi classificada como ausente (0), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++), conforme a intensidade.

5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CADERINAS E E N POR PCR EM TEMPO REAL

Células endometriais epiteliais (n=7 culturas) e estromais (n=6 culturas) foram centrifugadas e imediatamente misturadas com tampão de lise (Ambion, Austin TX), contendo tiocianato de guanidina, que lisa membranas celulares e rapidamente inativa ribonucleases. Posteriormente, o RNA foi extraído destas amostras, utilizando o kit *RNAqueous® - Micro* (Ambion, Austin, TX), no qual o lisato é misturado com etanol e aplicado a filtros de sílica que se ligam seletivamente ao RNA. O mRNA foi quantificado por espectroscopia a 260 e 280 nm e armazenado a -80°C, para posterior transcrição reversa.

Para a transcrição reversa, foi utilizado o kit *Clontech Sprint PowerScript Single Shots* (Clontech Laboratories, Mountain View, CA). O cDNA foi então congelado a -80°C, até o momento da amplificação. Os oligonucleotídeos iniciadores para caderinas E e N e para a proteína ribossomal S26 foram desenhados de forma a evitar a amplificação de contaminantes genômicos (*intron-spanning*) e encontram-se listados na Tabela 1.

O PCR em tempo real foi conduzido no *Abi-Prism 7700 Sequence Detection System*, usando o corante fluorescente *SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas as amostras foram testadas em duplicatas em placas de 96 poços apropriadas para PCR (Applied Biosystems). O volume final foi 25 µL, sendo 2 µL de cDNA, 2 µL do iniciador senso, 2 µL do iniciador anti-senso (ambos na concentração de 10 µg/ml), 2 µL de água

super-filtrada e 17 μ L de *SYBR Green Master Mix*. Os parâmetros de PCR foram um ciclo a 50°C por 2 minutos, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto.

Tabela 01 – Conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores usados no PCR em tempo real

	Seqüência (5' to 3')	Produtos (pares de bases)	Código de acesso no GenBank
Caderina N			
senso	accagcctccaactggtatc	109	NM001792
anti-senso	gcatgtgccctcaaataaac		
Caderina E			
senso	ttctgctgctcttgctgttc	135	NM004360
anti-senso	agtcaaagtcctggctcctt		
RPS26			
senso	tgtgcttccaagctgtatgtgaag	75	NM001029
anti-senso	cgattcctgactactttgctgtgaa		

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de adesão, invasão e proliferação foram feitos em triplicata ou quadruplicata, enquanto o PCR em tempo real foi feito em duplicata. A média das replicatas foi computada como um dado único ($n=1$). Foram utilizadas 08 culturas de células estromais e 10 culturas células epiteliais de pacientes diferentes.

Os dados dos ensaios de invasão, adesão e proliferação foram testados para normalidade e homogeneidade das variâncias e não diferiram significativamente da distribuição normal. Assim, os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste t pareado com correção de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os resultados do PCR em tempo real foram também testados para normalidade e homogeneidade das variâncias e apresentaram distribuição normal. As comparações foram feitas usando-se análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, preservando o pareamento das amostras de cada paciente.

4. RESULTADOS

1. EFEITOS DA ATIVINA A NA TAXA DE INVASÃO DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS NO MODELO DE PERITÔNIO

O modelo usado mostrou foi testado anteriormente com células estromais e células epitelióides da linhagem EM42 (Nair et al., 2007). A interação das células endometriais com uma monocamada confluyente de células mesoteliais se mostrou imprescindível para a ocorrência de invasão e consistência dos resultados. Assim, um ensaio com células epiteliais e um com células endometriais foram excluídos do presente estudo devido a um crescimento não-uniforme das células LP9 na câmara de invasão, que resultou na presença de pequenos agrupamentos de células mesoteliais, e não numa monocamada confluyente.

Em todos os demais experimentos, obteve-se a monocamada de células mesoteliais uniforme e as contagens celulares nas condições controle foram semelhantes às descritas anteriormente (Nair et al., 2007).

Ativina A promoveu um aumento na taxa de invasão de células endometriais através do modelo de peritônio *in vitro*, de modo dependente da dose, alcançando as maiores taxas de invasão como a dose de 25 ng/ml. A contagem de células endometriais epiteliais foi, em média, 800 ± 188 células por câmara de invasão, no grupo controle, enquanto, em presença de ativina A a 25 ng/ml, a contagem foi 1600 ± 388 (211 ± 36 por cento a contagem do controle, $p < 0,05$, figura 8A). Para as células estromais, a contagem foi, em média 648 ± 166 para o grupo controle e 1443 ± 373 no grupo tratado com ativina A 25 ng/ml (195 ± 28 por cento a contagem do controle, $p < 0,05$, figura 8B).

A seguir, testamos os efeitos desta dose de ativina em comparação com esta mesma dose acrescida de Inibina A na dose de 50 ng/ml ou folistatina na dose de 250 ng/ml. Nesta segunda série de experimentos, ativina A novamente promoveu um aumento na taxa de invasão, tanto de células epiteliais quanto estromais. Este efeito foi parcialmente revertido com a adição dos antagonistas, inibina A ou folistatina, atingindo significância estatística em células epiteliais tratadas com ativina A e folistatina ($p < 0,05$ comparado ao grupo ativina A, figura 8 C).

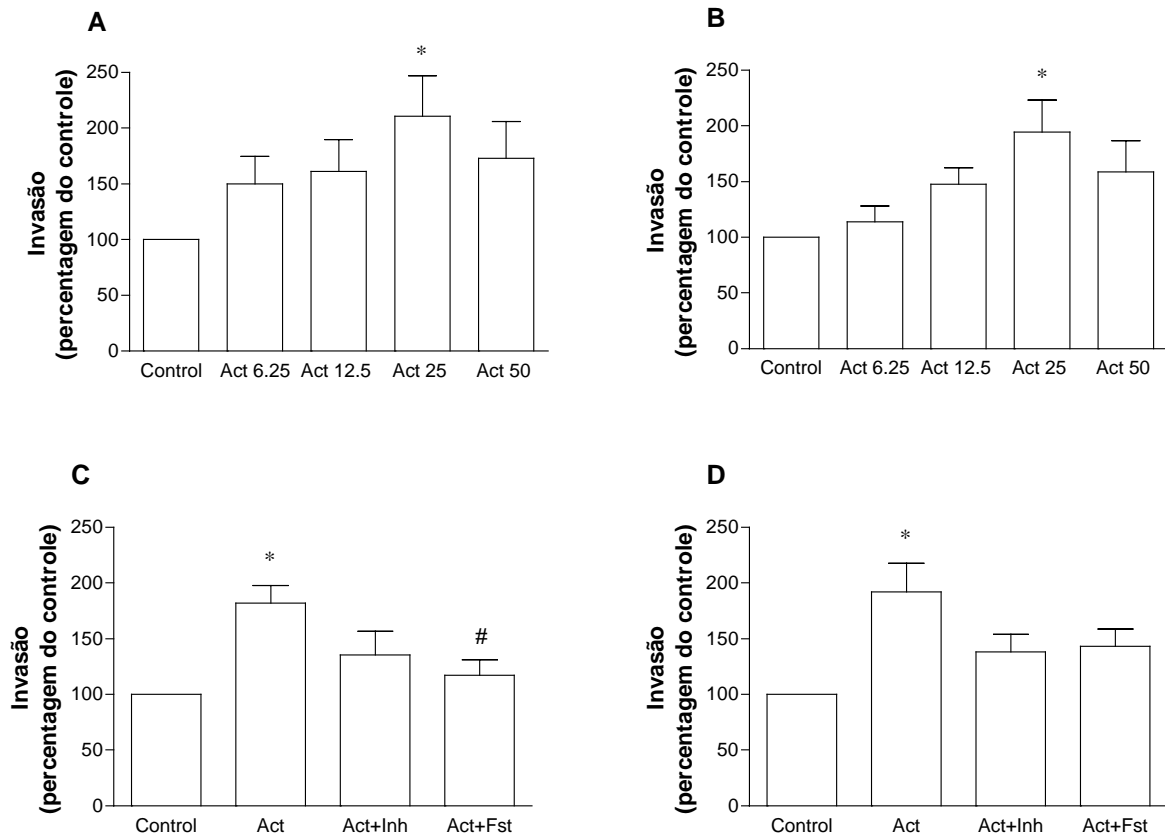


Figura 8 - Aumento percentual na taxa de invasão de células endometriais epiteliais (A e C) e estromais (B e D). Em A e B, efeito de diferentes concentrações de ativina A (de 6,25 a 50 ng/ml) em comparação ao controle. Em C e D, efeitos de ativina A a 25 ng/ml isoladamente (Act) ou em associação com inibina A 50 ng/ml (Act+Inh) ou folistatina 250 ng/ml (Act+Fst). (Médias \pm Erro Padrão da Média; * $p < 0,05$ vs. Control e # $p < 0,05$ vs. Act – Teste T com correção de Bonferroni).

2. EFEITOS DA ATIVINA A NAS TAXAS DE ADESÃO DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS ÀS CÉLULAS MESOTELIAIS

Para avaliar se o efeito encontrado no ensaio de invasão era devido a um aumento na adesão de células endometriais às mesoteliais, previamente à invasão, foram realizados ensaios de adesão com células endometriais tratadas com ativina e antagonistas, como descrito anteriormente. Nem ativina A isoladamente, nem combinações de ativina A com inibina A ou folistatina provocaram efeito significativo nas taxas de adesão de células endometriais epiteliais ou estromais à monocamada de células mesoteliais (figura 9).

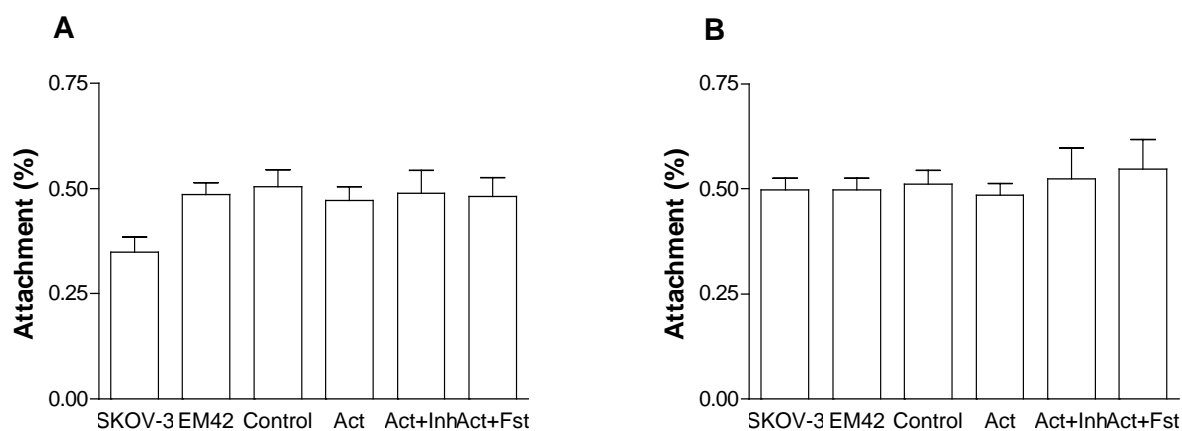


Figura 9 – Efeitos da ativina A isolada (Act), ou combinada com inibina A (Act+Inh) ou folistatina (Act+Fst) nas taxas de adesão de células endometriais (A) epiteliais e (B) estromais à monocamada de células mesoteliais (Média ± Erro Padrão da Média). SKOV-3 e EM42: linhagens celulares usadas como controles internos do ensaio, não tratadas.

3. EFEITOS DA ATIVINA A NAS TAXAS DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOMETRIAIS

Para excluir a possibilidade de uma interferência de alterações nas taxas de proliferação das células endometriais nos resultados obtidos nos ensaios de invasão, utilizamos ensaios de proliferação com MTT para células epiteliais e estromais tratadas com ativina A e seus antagonistas. Nenhum efeito significativo foi observado nas taxas de proliferação de células endometriais epiteliais e estromais em resposta aos diferentes tratamentos (Figura 10).

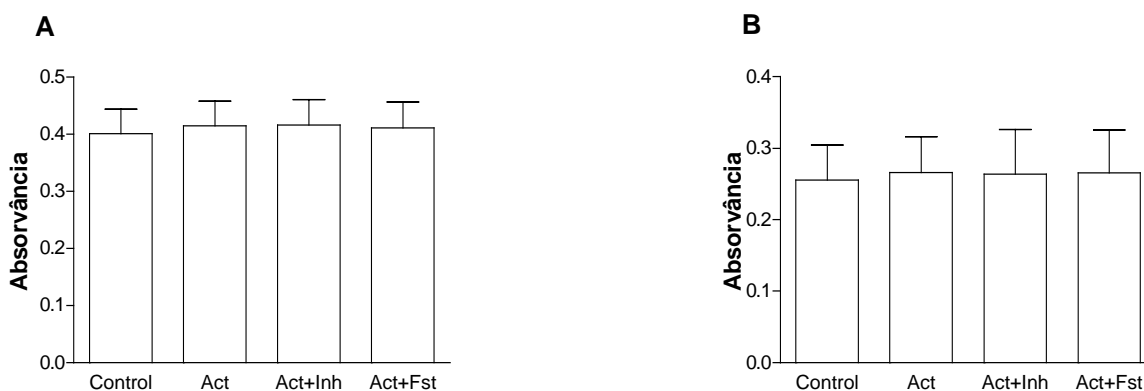


Figura 10 – Efeitos da ativina A isolada (Act), ou combinada com inibina A (Act+Inh) ou folistatina (Act+Fst) na proliferação de células endometriais (A) epiteliais e (B) estromais. Absorbância (Média \pm Erro Padrão da Média).

4. EFEITOS DA ATIVINA A NA EXPRESSÃO DE CADERINA E E CADERINA N EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS

Todas as culturas de células endometriais epiteliais expressaram caderina E e caderina N e S26, produzindo curvas de amplificação no PCR em tempo real como as observadas na figura 11. Células epiteliais tratadas com ativina A mostraram uma diminuição significativa na expressão de caderina E, em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$), e este efeito foi revertido pela associação de folistatina, embora a adição de inibina A não tenha produzido retorno da expressão de caderina E aos níveis iniciais. Os tratamentos não apresentaram qualquer efeito significativo na expressão de caderina N em células epiteliais (Figura 12).

Todas as culturas de células endometriais estromais expressaram caderinas E, caderina N e S26, entretanto, os tratamentos com ativina A, ativina A associada a inibina A e ativina A associada à folistatina não causaram nenhum efeito significativo na expressão de mRNA das caderinas (Figura 12).

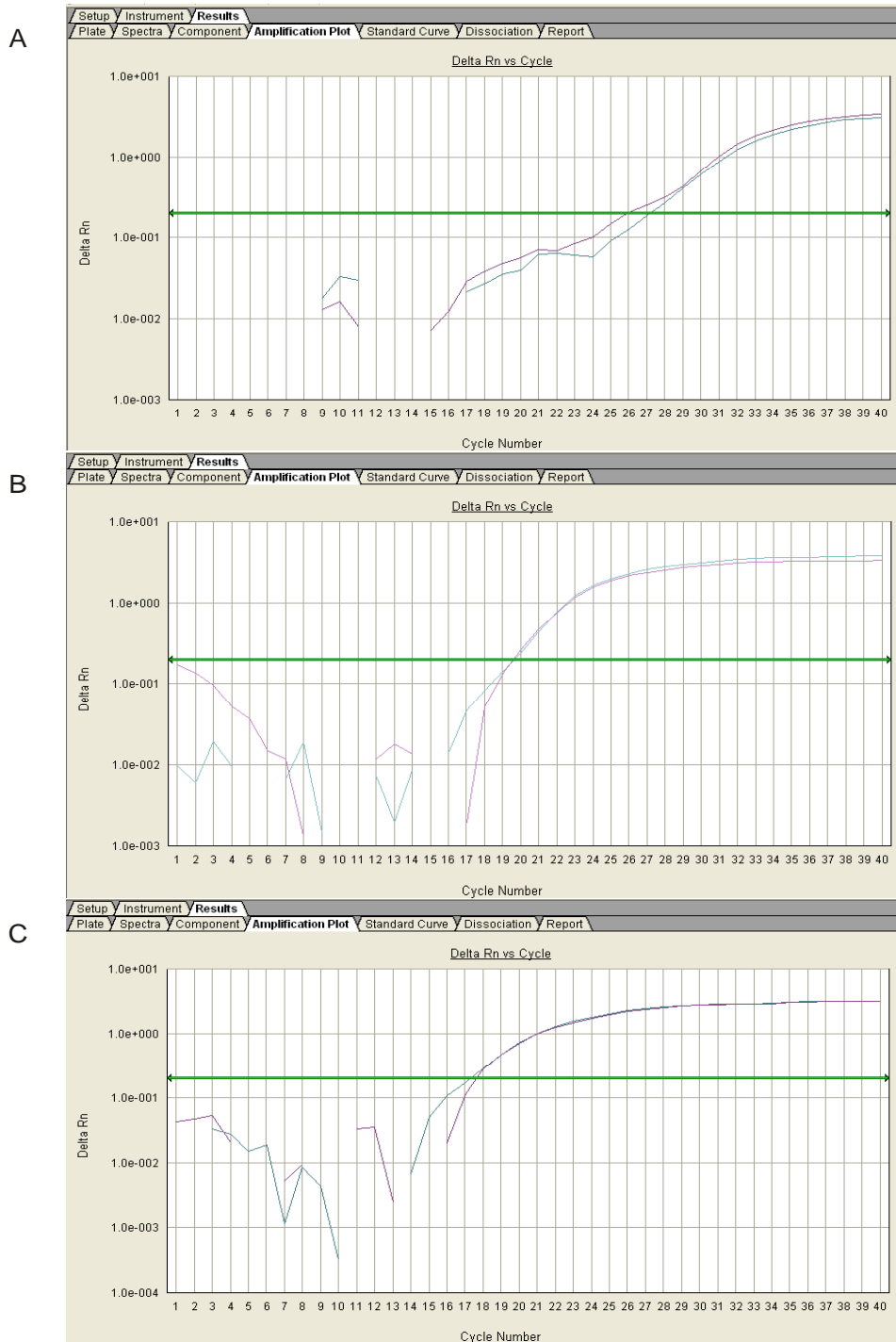


Figura 11 – Gráficos de amplificação do PCR em tempo real de uma amostra de células epiteliais. A) caderina E, B) caderina N, C) S26.

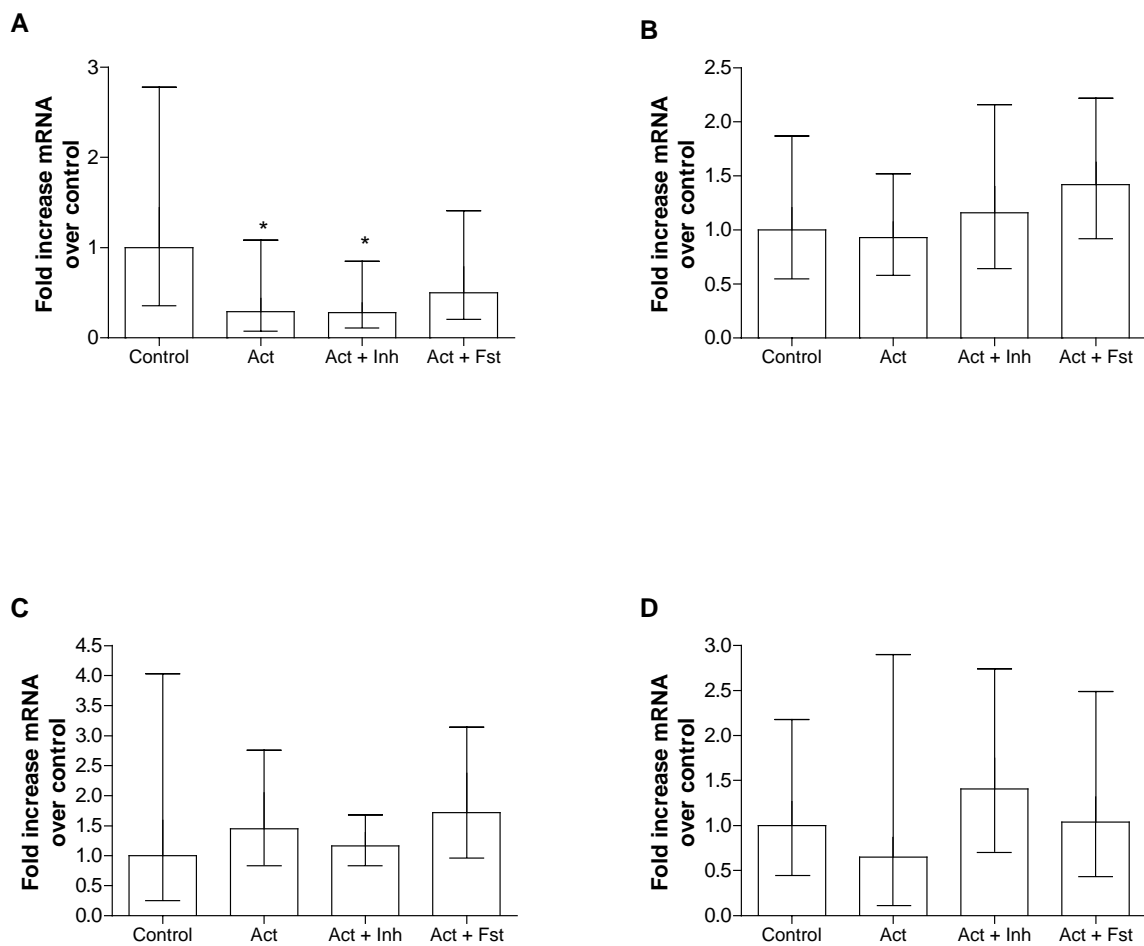


Figura 12 – Efeitos da ativina A, inibina A e folistatina na expressão de mRNA de caderinas E (A, C) e N (B, D) por células endometriais epiteliais (A, B) e estromais (C,D), estimuladas por ativina A 25 ng/ml isoladamente (Act) ou em combinação com inibina A 50 ng/ml (Act + Inh) ou Folistatina 250 ng/ml (Act+Fst) (Média \pm Intervalo de Confiança).

5. DEMONSTRAÇÃO DOS RECEPTORES DE ATIVINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS

Células epiteliais e estromais de todas as culturas coraram positivamente para receptores ActRIIA e ActRIB (Figura 12). A intensidade da coloração foi classificada como moderada, em média, sendo semelhante para ambos os receptores, nas células estromais e epiteliais.

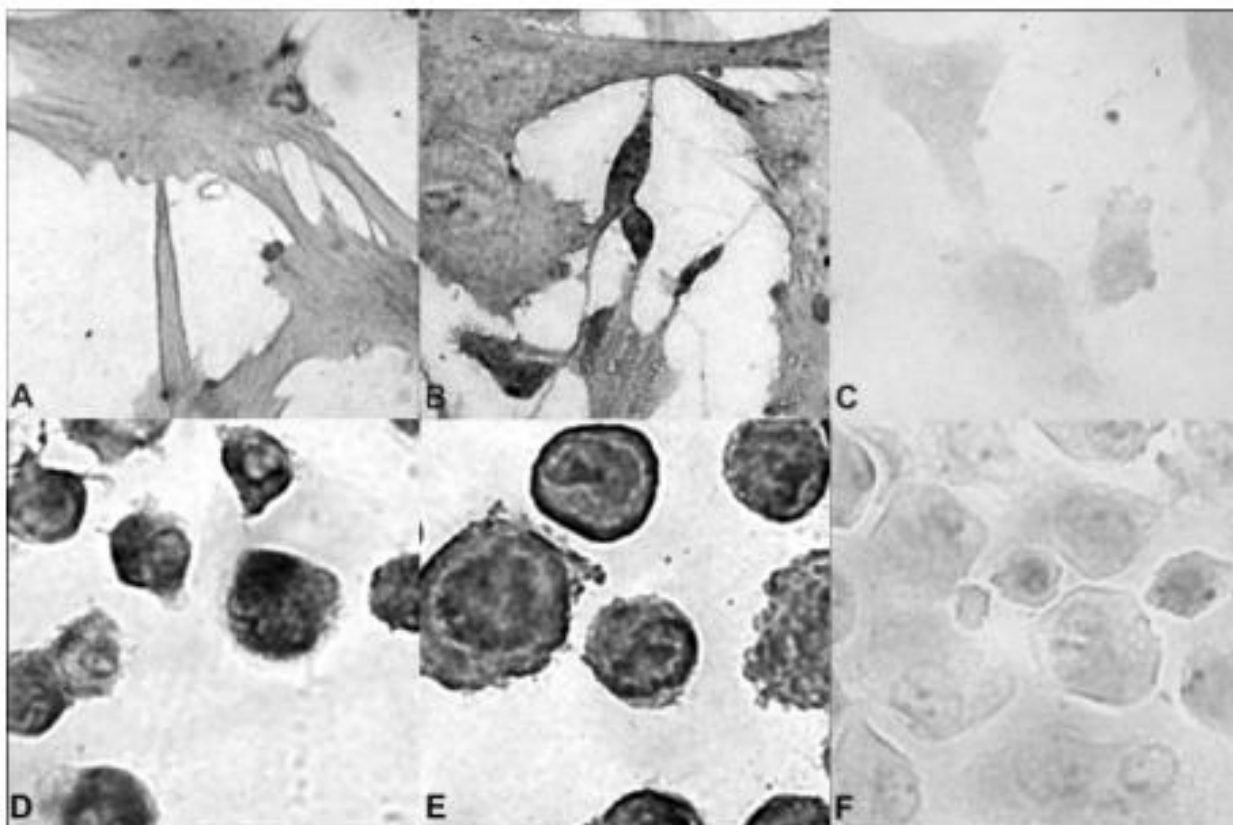


Figura 13: Localização imunocitoquímica dos receptores de ativina ActRIIA (**A, D**) e ActRIB (**B, E**) em células endometriais epiteliais (**A-C**) e células endometriais estromais (**D-F**) imediatamente antes da estimulação com ativina A e seus antagonistas. **C, F:** controles negativos.

5. DISCUSSÃO

A patogênese e a fisiopatologia da endometriose não são completamente compreendidas até o presente. Em relação à endometriose superficial, o fluxo menstrual retrógrado parece ser o evento inicial, mas o que desencadeia a doença permanece obscuro, considerando que aproximadamente 90% das mulheres em idade reprodutiva apresentam fluxo retrógrado e apenas 3 a 10% têm endometriose (Speroff et al., 1999).

Conforme a teoria de Sampson, seguindo o fluxo retrógrado pelas tubas uterinas, as células endometriais no sangue menstrual escapam dos mecanismos de defesa, aderem ao mesotélio peritoneal e então invadem o tecido peritoneal, dando origem a uma nova lesão endometriótica. Posteriormente, a geração de um suprimento sangüíneo adequado e a capacidade de escapar dos mecanismos de defesa imunológicos ou a geração de respostas sub-ótimas garantiriam a persistência das lesões (Giudice e Kao, 2004).

Entretanto, o estudo de cada uma das variáveis envolvidas nos processos acima em mulheres acometidas ou em modelos animais é extremamente difícil, dadas a diversidade e a simultaneidade dos eventos fisiopatológicos envolvidos.

A criação de ensaios *in vitro* para avaliar e quantificar separadamente a adesão e a invasão das células endometriais em modelos de peritônio representou uma ferramenta importante para o estudo de citocinas e moléculas de adesão potencialmente envolvidas nesses processos. Os primeiros modelos utilizaram explantes de endométrio e peritônio humanos e, a seguir, foram utilizadas células endometriais e mesoteliais humanas em cultura.

Posteriormente, a utilização da linhagem de células mesoteliais LP9 mostrou-se adequada, com resultados reprodutíveis e semelhantes aos obtidos nos ensaios com células mesoteliais de biópsia de peritônio, apresentando ainda a vantagem de menor variabilidade entre os ensaios (Lucidi et al., 2005a; Witz et al., 2002a; Witz et al., 2002c; Witz et al., 1999; Witz et al., 2001).

Outros pesquisadores têm usado âmnio como modelo de peritônio (Groothuis et al., 1998). Entretanto, tal modelo, apesar de apresentar semelhanças com o peritônio humano, poderia introduzir outras variáveis no estudo, devido a características próprias da membrana amniótica. Apesar de apresentar semelhanças com as células mesoteliais peritoneais, morfológica e na expressão de moléculas de adesão, as células da membrana amniótica derivam de um ambiente muito particular, estando sujeitas a condições não encontradas na cavidade peritoneal.

A interação das células endometriais com as células mesoteliais no processo de adesão e invasão peritoneal tem se mostrando de extrema importância na patogênese da endometriose, uma vez que esta interação, por si só é capaz de potencializar o fenômeno invasivo *in vitro* e estimular a expressão de vários genes possivelmente envolvidos (Nair et al., 2007).

Apesar dos efeitos dos esteróides sexuais descritos na evolução da endometriose, estudo conduzido com biópsias endometriais de pacientes com ou sem endometriose, em diferentes fases do ciclo menstrual, e avaliando histologicamente áreas de adesão e/ou invasão, não observou diferenças significativas nos resultados conforme as fases do ciclo, a presença de

endometriose ou o estágio da mesma (Debrock et al., 2002). Isto pode ser atribuído a uma “de-diferenciação” possivelmente sofrida pelas células endometriais *in vitro*, sem adição de esteróides ao meio de cultura.

Assim, os modelos usados neste estudo para avaliar adesão e invasão de células mesoteliais ao peritônio utilizam células endometriais epiteliais e estromais obtidas de biópsias endometriais de pacientes sem endometriose, em fase proliferativa, e células mesoteliais LP9. Tais ensaios, obviamente, não representam a totalidade de células e os fatores humorais presentes no ambiente peritoneal, que podem favorecer o aparecimento da endometriose. No entretanto, representam poderoso instrumento para o estudo isolado de fatores potencialmente envolvidos, facilitando sobremaneira o estudo dos fenômenos adesivos e invasivos.

Ativina A é uma das citocinas recentemente descritas na lesão endometriótica. O presente estudo provê evidências para a estimulação de propriedades invasivas nas células endometriais pela ativina A. Células endometriais epiteliais e estromais tratadas com ativina A por 24 horas foram mais invasivas no modelo *in vitro* de peritônio, de modo dependente da dose, alcançando as maiores taxas de invasão com a dose de 25 ng/ml. O aumento nas taxas de invasão foi superior a 100%, considerando ambos os tipos celulares (epiteliais e estromais). Além disso, inibina A e folistatina, adicionadas às células tratadas com ativina, reverteram, ainda que parcialmente, o efeito da ativina. Interessantemente, com a dose de ativina A de 50ng/ml, observamos uma diminuição não significativa do efeito provocado pela dose de 25 ng/ml.

Além disto poder se dever à variabilidade inerente ao modelo, há que se considerar a possibilidade de que esse incremento de 100% na concentração de ativina possa ativar outras respostas celulares que determinem um fenótipo menos invasor.

Altas doses de ativina A podem, por exemplo, ter estimulado a produção celular de Smad 7, inibitória, e de folistatina, um mecanismo fisiológico já descrito, que é responsável pela modulação da ação da ativina (Bilezikjian et al., 2004). A comprovação desta hipótese poderia ser obtida através da dosagem de folistatina no meio de cultura após as 24 horas de tratamento com as diferentes doses de ativina A.

O antagonismo parcial dos efeitos da ativina A, observado quando as células endometriais foram tratadas também com inibina A, na concentração de 50 ng/ml pode estar relacionado à expressão de betaglicano nestas células. Isto porque a existência deste co-receptor é a condição que propicia que a inibina seja um antagonista competitivo da ativina, a despeito de sua reduzida afinidade pelo receptor tipo II. Alteração na expressão de betaglicano pelas células endometriais em cultura poderia ser comprovada através de imunocitoquímica.

Há ainda a possibilidade de que a ativina A tenha efeitos nas células mesoteliais, levando a produção de citocinas que atuem nas células endometriais promovendo assim a invasão através de uma ação parácrina. Tal hipótese confere ao mesotélio peritoneal um papel mais ativo, ao invés de “sofrer passivamente” a invasão pelas células endometriais. Estudos anteriores

mostraram, por exemplo que, em co-cultura com células endometriais, as células mesoteliais exibem uma produção aumentada de CSF-1, um potencial agente pró-invasão (dados não publicados). O estudo das células mesoteliais, que expressam os receptores da ativina e se constituem assim em potenciais alvos de sua ação, poderia revelar efeitos na produção de marcadores de invasão.

Nossos resultados são concordantes com estudos prévios, em outros tipos celulares, que verificaram que a ativina A promove aumento na invasão de células de carcinoma ovariano através de membranas porosas cobertas com Matrigel®, efeito antagonizado pela inibina (Steller et al., 2005). Também no carcinoma esofageano, a maior expressão de ativina A parece estar ligada à invasão em profundidade e a um pior prognóstico (Yoshinaga et al., 2004).

Em outros tipos de cânceres, um papel da ativina A vem sendo proposto. Em pacientes com adenocarcinoma endometrial, a concentração sérica de ativina A está aumentada, se comparada a mulheres de mesma faixa etária sem carcinoma, ao passo que a remoção do tumor promove a queda dos níveis séricos de ativina. Nos carcinomas de colo do útero, apesar de as concentrações séricas de ativina A não diferirem significativamente dos controles, as mesmas diminuíram após cirurgia para remoção do tumor (Petraglia et al., 1998).

Desse modo, vem sendo estabelecida, de forma consistente, uma associação entre ativinas e doenças envolvendo fenômenos de invasão celular. E, na falta de um antagonismo pela inibina, a atividade aumentada de ativina A

parece favorecer a gênese de tumores. De fato, a associação entre os desbalanços no sistema ativina-inibina e diversos cânceres já foi relatada várias vezes, indicando que ativina A parece estar relacionada a fenômenos invasivos e metastáticos, apesar de os mecanismos serem ainda pouco esclarecidos (Florio et al., 2005; Otani et al., 2001; Petraglia et al., 1998).

Ensaio de adesão e proliferação foram feitos para excluir a possível interferência de um efeito da ativina A nestes fenômenos, distorcendo os resultados do ensaio de invasão. A ausência de qualquer efeito detectado nestes ensaios nos habilita a afirmar que o efeito da ativina é principalmente promover o fenômeno de invasão transmesotelial que se segue à adesão inicial das células endometriais ao mesotélio peritoneal.

Embora seja possível que a ativina A influencie a expressão e a atividade de integrinas, dados anteriores mostram que as integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ não têm papel relevante na adesão das células endometriais às mesoteliais (Ramos et al., 1996; Witz et al., 2002b).

Em nosso estudo, a ativina A não promoveu efeito significativo nas taxas de proliferação das células endometriais tratadas. A literatura mostra achados diversos a respeito dos efeitos da ativina em proliferação celular. Estes efeitos são *Smad*-dependentes e específicos para cada tipo celular estudado, sendo ainda possivelmente influenciados por fatores locais, como as concentrações de folistatina.

Em linhagens celulares de carcinomas ovarianos, o efeito da ativina foi heterogêneo, com aumento da proliferação celular em algumas, diminuição em

outras e ausência de efeito em outras. Além disto, ativina A mostrou-se capaz de estimular também comportamento de invasão na linhagem SKOV-3 (Steller et al., 2005). Em outros tipos celulares, ativina induz apoptose e reduz angiogênese; podendo inibir a proliferação celular e a gênese tumoral (Chen et al., 2006). Em linhagens celulares de carcinoma endometrial que possuem receptor de estrogênio, a ativina parece diminuir a proliferação celular, ao contrário de linhagens não responsivas ao estrogênio, nas quais a ativina estimula a proliferação celular (Di Simone et al., 2002), sugerindo uma complexa modulação da proliferação.

Como dito anteriormente, a ausência de efeito da ativina nas taxas de proliferação das células endometriais, assim como nas taxas de adesão destas ao peritônio, nos leva a crer que ações parácrinas da ativina possam estimular o comportamento invasivo de células endometriais, promovendo a gênese da lesão endometriótica. A existência de um papel para ativina A na endometriose é subsidiada pela expressão de ativina e seus receptores no endométrio sadio, em lesões endometrióticas peritoneais e nas células mesoteliais peritoneais, assim como no endometrioma (Florio et al., 1998; Florio et al., 2003; Jones et al., 2000; Jones et al., 2002c; Reis et al., 2001).

Além de seu papel bem estabelecido na decidualização do endométrio (Jones et al., 2002a), ativina tem sido também implicada na diferenciação de outros tipos celulares, como as células do trofoblasto, estimulando a migração destas células e a produção de fibronectina e metaloproteinases (Caniggia et al., 1997). A expressão destas moléculas tem importante papel na diferenciação e

função do trofoblasto, cujas células devem ser dotadas de capacidade de invadir a decídua e os vasos sanguíneos maternos, formando vasos de baixa resistência que irão compor a placenta.

Ademais, nas células endometriais, o papel da ativina parece ir além das modificações morfológicas da decidualização desencadeadas pela progesterona. Estudos mostram que o tratamento com a ativina A *in vitro* promoveu um aumento na produção de metaloproteinases pelas células endometriais estromais e epiteliais (Jones et al., 2006a).

A regulação da produção de metaloproteinases pelas células endometriais é complexa, envolvendo vários fatores, dentre os quais, a progesterona. Os estudos mostram que a progesterona é capaz de inibir a expressão de MMPs no endométrio. Entretanto, o endométrio de pacientes com endometriose e o tecido endométrico apresentam aparentemente uma diminuição na resposta à progesterona, com capacidade de decidualização reduzida (Klemmt et al., 2006), o que pode ser uma das razões para a maior expressão de metaloproteinases nestes tecidos (Giudice e Kao, 2004).

Assim, os achados de que células endometriais de mulheres com endometriose produzem mais ativina A *in vitro*, se comparadas a células endometriais de mulheres saudáveis (Rombauts et al., 2006) e os efeitos da ativina A na expressão endometrial de MMPs sugerem que a ativina está envolvida no aumento da expressão de MMPs na endometriose, potencialmente favorecendo o fenômeno de invasão das células endometriais através do mesotélio peritoneal.

A participação das MMPs na endometriose tem sido intensamente estudada e bem estabelecida, uma vez que a fisiopatologia da endometriose envolve processos de invasão celular e remodelamento tecidual. Vários estudos mostram alterações na expressão destas enzimas em modelos experimentais e em pacientes com endometriose (Abdallah et al., 2006; Bruner-Tran et al., 2002; Bruner-Tran et al., 2006; Chung et al., 2002; Chung et al., 2001; Collette et al., 2006).

Além dos efeitos nas MMPs endometriais, têm sido relatadas ações da ativina A na regulação da expressão de caderinas, moléculas homofílicas de adesão celular. Desregulação nestas, por sua vez, vem sendo associada à endometriose e a diversos tipos de cânceres, podendo favorecer fenômenos de invasão e migração celular.

A ocorrência de alterações na expressão de caderinas é particularmente interessante na endometriose, pois pode fornecer subsídio para duas das teorias explicadoras da patogênese da doença: a diminuição da expressão de caderinas pode favorecer o destacamento das células endometriais, a migração pelas trompas e o estabelecimento de novos contatos celulares no local da lesão futura, segundo a teoria do fluxo retrógrado. Por outro lado, a menor expressão de caderina E e a maior expressão de caderina N na lesão endometriótica podem também favorecer a teoria da metaplasia, uma vez que este padrão se assemelha ao das células mesoteliais, que sofreriam metaplasia, originando a lesão (Poncelet et al., 2002).

Os resultados dos estudos das caderinas na endometriose são variados e algumas vezes conflitantes. Alguns estudos mostram expressão diminuída de caderina E no tecido endometriótico comparado ao endométrio eutópico (Poncelet et al., 2002), o que tem sido associado a um potencial invasivo aumentado destas células. Entretanto, outros autores encontraram padrões de expressão similares entre epitélio eutópico de mulheres com a doença e células endometrióticas (Chen et al., 2002). É sabido que o endométrio intra-uterino destas pacientes difere do de mulheres saudias em vários aspectos. Isto pode explicar os resultados aparentemente discordantes dos estudos.

Aqui demonstramos que células endometriais epiteliais e estromais, em cultura, expressam caderinas E e N, dado que corrobora estudos anteriores. A caderina N foi identificada em cistos endometrióticos e lesões endometrióticas peritoneais (Zeitvogel et al., 2001), assim como em endométrio eutópico normal, principalmente em células epiteliais e em células estromais na fase proliferativa (Tsuchiya et al., 2006). Já a caderina E tem expressão constante nas células epiteliais do endométrio ao longo do ciclo menstrual (Tsuchiya et al., 2006) e, embora na endometriose os estudos mostrem resultados variáveis, acredita-se que haja uma gradação decrescente na expressão de caderina E entre tecido de lesões endometrióticas peritoneais, endométrio eutópico de mulheres com endometriose e em endométrio eutópico de mulheres sem endometriose (Scotti et al., 2000).

A expressão de caderina E nas células estromais não havia sido relatada na literatura. De fato, a caderina E é uma molécula tipicamente epitelial, e sua

expressão em células estromais era inesperada, uma vez que os métodos de isolamento e cultura empregados no estudo fornecem uma pureza superior a 97% para células estromais. Entretanto, é possível que o cultivo *in vitro* destas células, separadamente da complexa estrutura tecidual endometrial, induza mudanças fenotípicas celulares, levando à expressão destas moléculas. Entretanto, a expressão destas caderinas nas células estromais não se mostrou diferente com os tratamentos empregados, e provavelmente não se constituiu em fator determinante na invasividade das mesmas.

Dados de estudos sobre câncer sugerem que a caderina N se relaciona a fenômenos de invasão em profundidade e migração, agindo como um “*path-finder*”. De fato, é possível que caderina N contribua para o estabelecimento de contatos estáveis entre células endometriais e mesoteliais, possibilitando a invasão, uma vez que células mesoteliais também expressam caderina N (Witz, 2005). Em lesões endometrióticas peritoneais, células expressando caderina E parecem ser menos freqüentes que no endométrio eutópico, e a maioria das biópsias de lesões endometrióticas mostra células com expressão de caderina N (Gaetje et al., 1997; Poncelet et al., 2002; Zeitvogel et al., 2001).

A presença de células com diferentes padrões de expressão de caderinas em material obtido de lesões endometrióticas parece se correlacionar com o comportamento invasivo destas células, tendo sido observado que células negativas para caderina E e positivas para caderina N exibem potencial invasivo. Isto parece refletir estágios distintos de diferenciação e comportamento biológico das lesões (Zeitvogel et al., 2001). Células negativas

para caderina E, obtidas de focos de endometriose pélvica, são invasivas num ensaio de invasão em colágeno *in vitro*, ao passo que nenhum comportamento invasivo foi observado em células que expressavam esta caderina (Gaetje et al., 1997). Linhagens de células endometrióticas foram obtidas através de biópsia peritoneal, seguida de cultura primária e imortalização com o vírus SV40. As linhagens que exibiram propriedades invasivas em membranas cobertas com matrigel não expressavam caderina E e expressavam caderina N (Zeitvogel et al., 2001).

O papel exato das caderinas na endometriose, entretanto, não é completamente elucidado. Comparado a outros tumores císticos do ovário, a expressão de caderinas pelo endometrioma é semelhante aos tumores *borderline* (Darai et al., 1998). Assim, alguns autores sugerem que a expressão comparável de caderinas E e N no endometrioma e nos tumores *borderline* do ovário, apesar da origem completamente diversa destes últimos, possa refletir uma similaridade no comportamento destas entidades (Poncelet et al., 2002).

Estudos têm ligado a atividade de caderinas. Em embriões de *Xenopus laevis*, a atividade promove uma diminuição da atividade de caderina C durante a gastrulação, associada a uma diminuição da expressão de caderina E (Briher e Gumbiner, 1994). No carcinoma do esôfago, a atividade A parece estimular a expressão de caderina N, que se correlaciona positivamente com invasão em profundidade, sem, entretanto, apresentar correlação com a expressão de caderina E (Yoshinaga et al., 2004).

No presente estudo, observamos que ativina A promoveu uma diminuição da expressão de mRNA da caderina E em células endometriais epiteliais em cultura, efeito revertido pela adição de folistatina às culturas. A menor expressão de caderina E pode contribuir para o aumento da taxa de invasão observado em células epiteliais tratadas com ativina A, o que encontra respaldo em estudos anteriores.

No entanto, outros mecanismos estão provavelmente envolvidos no efeito promotor da invasão da ativina A, particularmente em células endometriais estromais, nas quais a expressão das caderinas não foi alterada pelos tratamentos com ativina, inibina e folistatina.

O esclarecimento do papel exato destas moléculas na formação das lesões endometrióticas pode resultar em descobertas de uso clínico, tanto no auxílio ao diagnóstico, como nas opções de tratamento.

Até o momento, os estudos não nos fornecem possibilidades concretas para uso da ativina A como instrumento diagnóstico ou alvo terapêutico na endometriose. No entanto, os desarranjos observados na expressão de folistatina, por exemplo, no tecido endometriótico podem nos prover um marcador viável para rastreamento da endometriose (Torres et al., 2007). De fato, o complexo sistema ativina-inibina-folistatina pode ter aplicações práticas no manejo da endometriose num futuro próximo.

6. CONCLUSÃO

Do presente estudo conclui-se que:

- Ativina A na dose de 25 ng/ml promoveu um aumento significativo das taxas de invasão peritoneal por células endometriais epiteliais e estromais;
- Não houve aumento nas taxas de adesão de células endometriais às células mesoteliais peritoneais;
- A ativina A não promoveu alteração nas taxas de proliferação de células endometriais epiteliais ou estromais;
- Ainda que parcialmente, inibina A e folistatina provocaram diminuição do efeito pró-invasão causado pela ativina;
- Células endometriais epiteliais e estromais expressam pelo menos um receptor tipo I e um receptor tipo II de ativina;
- Ativina A na dose de 25 ng/ml provocou uma diminuição da expressão de caderina E pelas células endometriais epiteliais, o que pode contribuir para aquisição de propriedades invasivas por células endometrióticas;

Assim, nossos resultados mostram que ativina A pode influenciar a gênese da lesão endometriótica, promovendo a invasão peritoneal por células endometriais epiteliais e estromais em um modelo de peritônio *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. A., KANG, S., et al. Matrix metalloproteinase-9 activity in the plasma of patients after surgical resection of endometriomas. **Fertil Steril**, 85, 6, 1847-8, Jun, 2006.

ABRAO, M. S., NEME, R. M., et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **Int J Gynaecol Obstet**, 82, 1, 31-40, Jul, 2003.

ASRM, T. P. C. O. Endometriosis and infertility. **Fertil Steril**, 86, 5 Suppl, S156-60, Nov, 2006a.

ASRM, T. P. C. O. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. **Fertil Steril**, 86, 5 Suppl, S18-27, Nov, 2006b.

ATTIA, G. R., ZEITOUN, K., et al. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, 85, 8, 2897-902, Aug, 2000.

ATTISANO, L., SILVESTRI, C., et al. The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGFbeta and activin signalling. **Mol Cell Endocrinol**, 180, 1-2, 3-11, Jun 30, 2001.

ATTISANO, L. and TUEN LEE-HOEFLICH, S. The Smads. **Genome Biol**, 2, 8, REVIEWS3010, 2001.

BEDAIWY, M. A. and FALCONE, T. Laboratory testing for endometriosis. **Clin Chim Acta**, 340, 1-2, 41-56, Feb, 2004.

BEDAIWY, M. A., FALCONE, T., et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. **Hum Reprod**, 17, 2, 426-31, Feb, 2002.

BERNARD, D. J., CHAPMAN, S. C., et al. An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. **Mol Cell Endocrinol**, 180, 1-2, 55-62, Jun 30, 2001.

BILEZIKJIAN, L. M., BLOUNT, A. L., et al. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. **Mol Cell Endocrinol**, 225, 1-2, 29-36, Oct 15, 2004.

BRIEHER, W. M. and GUMBINER, B. M. Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of Xenopus animal caps. **J Cell Biol**, 126, 2, 519-27, Jul, 1994.

BROSENS, I. A. and BROSENS, J. J. Endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 90, 2, 159-64, Jun, 2000a.

BROSENS, I. A. and BROSENS, J. J. Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease?, **Hum Reprod**, 15, 1, 1-3, Jan, 2000b.

BRUNER-TRAN, K. L., EISENBERG, E., et al. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. **J Clin Endocrinol Metab**, 87, 10, 4782-91, Oct, 2002.

BRUNER-TRAN, K. L., ZHANG, Z., et al. Down-regulation of endometrial matrix metalloproteinase-3 and -7 expression in vitro and therapeutic regression of experimental endometriosis in vivo by a novel nonsteroidal progesterone receptor agonist, tanaproget. **J Clin Endocrinol Metab**, 91, 4, 1554-60, Apr, 2006.

BUSTER, J. E. Activins, inhibins, and follistatins in reproduction. **J Soc Gynecol Investig**, 10, 4, 177, May, 2003.

CANIGGIA, I., LYE, S. J., et al. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. **Endocrinology**, 138, 9, 3976-86, Sep, 1997.

CARNEIRO, M. M., MORSCH, D. M., et al. Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in pelvic endometriosis. **Gynecol Endocrinol**, 23, 4, 188-92, Apr, 2007.

CHEN, G. T., TAI, C. T., et al. Identification of the cadherin subtypes present in the human peritoneum and endometriotic lesions: potential role for P-cadherin in the development of endometriosis. **Mol Reprod Dev**, 62, 3, 289-94, Jul, 2002.

CHEN, Y. G., WANG, Q., et al. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Exp Biol Med (Maywood)**, 231, 5, 534-44, May, 2006.

CHUNG, H. W., LEE, J. Y., et al. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. **Fertil Steril**, 78, 4, 787-95, Oct, 2002.

CHUNG, H. W., WEN, Y., et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. **Fertil Steril**, 75, 1, 152-9, Jan, 2001.

COLLETTE, T., MAHEUX, R., et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. **Hum Reprod**, Jul 31, 2006.

DARAI, E., LEBLANC, M., et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in ovarian endometrial cysts. **Hum Reprod**, 13, 5, 1346-52, May, 1998.

DE WINTER, J. P., TEN DIJKE, P., et al. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. **Mol Cell Endocrinol**, 116, 1, 105-14, Jan 15, 1996.

DEBROCK, S., VANDER PERRE, S., et al. In-vitro adhesion of endometrium to autologous peritoneal membranes: effect of the cycle phase and the stage of endometriosis. **Hum Reprod**, 17, 10, 2523-8, Oct, 2002.

DECHAUD, H., WITZ, C. A., et al. Mesothelial cell-associated hyaluronic acid promotes adhesion of endometrial cells to mesothelium. **Fertil Steril**, 76, 5, 1012-8, Nov, 2001.

DHEENADAYALU, K., MAK, I., et al. Aromatase P450 messenger RNA expression in eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis. **Fertil Steril**, 78, 4, 825-9, Oct, 2002.

DI SIMONE, N., SCHNEYER, A. L., et al. Regulation of endometrial adenocarcinoma cell proliferation by Activin-A and its modulation by 17beta-estradiol. **Mol Cell Endocrinol**, 192, 1-2, 187-95, Jun 28, 2002.

ETHIER, J. F. and FINDLAY, J. K. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. **Reproduction**, 121, 5, 667-75, May, 2001.

FANG, J., YIN, W., et al. Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene. **Biochem Biophys Res Commun**, 228, 3, 669-74, Nov 21, 1996.

FLORIO, P., CIARMELA, P., et al. Inhibin alpha-subunit and the inhibin coreceptor betaglycan are downregulated in endometrial carcinoma. **Eur J Endocrinol**, 152, 2, 277-84, Feb, 2005.

FLORIO, P., LUISI, S., 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**, 13, 9, 2606-11, Sep, 1998.

FLORIO, P., SEVERI, F. M., 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**, 10, 4, 237-43, May, 2003.

GAETJE, R., KOTZIAN, S., et al. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. **Am J Pathol**, 150, 2, 461-7, Feb, 1997.

GAZVANI, R. and TEMPLETON, A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, 76, 2, 117-26, Feb, 2002.

GIUDICE, L. C. and KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, 364, 9447, 1789-99, Nov 13-19, 2004.

GRAY, P. C., BILEZIKJIAN, L. M., et al. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. **Mol Cell Endocrinol**, 180, 1-2, 47-53, Jun 30, 2001.

GROOTHUIS, P. G., KOKS, C. A., et al. Adhesion of human endometrium to the epithelial lining and extracellular matrix of amnion in vitro: an electron microscopic study. **Hum Reprod**, 13, 8, 2275-81, Aug, 1998.

HARRISON, C. A., WIATER, E., et al. Modulation of activin and BMP signaling. **Mol Cell Endocrinol**, 225, 1-2, 19-24, Oct 15, 2004.

IRWIN, J. C., KIRK, D., et al. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. **Fertil Steril**, 52, 5, 761-8, Nov, 1989.

JONES, K. L., DE KRETZER, D. M., et al. Activin A and follistatin in systemic inflammation. **Mol Cell Endocrinol**, 225, 1-2, 119-25, Oct 15, 2004.

JONES, R. L., FINDLAY, J. K., et al. Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. **Endocrinology**, 147, 2, 724-32, Feb, 2006a.

JONES, R. L., FINDLAY, J. K., et al. The role of activins during decidualisation of human endometrium. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, 46, 3, 245-9, Jun, 2006b.

JONES, R. L., SALAMONSEN, L. A., et al. 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**, 6, 12, 1107-17, Dec, 2000.

JONES, R. L., SALAMONSEN, L. A., et al. Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, 87, 8, 4001-4, Aug, 2002a.

JONES, R. L., SALAMONSEN, L. A., et al. Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy. **Trends Endocrinol Metab**, 13, 4, 144-50, May-Jun, 2002b.

JONES, R. L., SALAMONSEN, L. A., et al. Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells; consistent with a role for activins during decidualization. **Mol Hum Reprod**, 8, 4, 363-74, Apr, 2002c.

KLEMMT, P. A., CARVER, J. G., et al. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. **Fertil Steril**, 85, 3, 564-72, Mar, 2006.

KOZIAN, D. H., ZICHE, M., et al. The activin-binding protein follistatin regulates autocrine endothelial cell activity and induces angiogenesis. **Lab Invest**, 76, 2, 267-76, Feb, 1997.

LEBLANC, M., PONCELET, C., et al. Alteration of CD44 and cadherins expression: possible association with augmented aggressiveness and invasiveness of endometrial carcinoma. **Virchows Arch**, 438, 1, 78-85, Jan, 2001.

LUCIDI, R. S., WITZ, C. A., et al. A novel in vitro model of the early endometriotic lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells. **Fertil Steril**, 84, 1, 16-21, Jul, 2005a.

LUCIDI, R. S., WITZ, C. A., et al. Modeling endometriosis. **Fertil Steril**, 84, 1, 39, Jul, 2005b.

LUISI, S., FLORIO, P., et al. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. **Eur J Endocrinol**, 145, 3, 225-36, Sep, 2001.

MELL, L. K., MEYER, J. J., et al. Prognostic significance of E-cadherin protein expression in pathological stage I-III endometrial cancer. **Clin Cancer Res**, 10, 16, 5546-53, Aug 15, 2004.

MURPHY, A. A. Clinical aspects of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, 955, 1-10; discussion 34-6, 396-406, Mar, 2002.

MYLONAS, I., JESCHKE, U., 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**, 122, 5, 461-71, Nov, 2004.

NAIR, A. S., LUCIDI, R. S., et al. Endometrial Cell Binding to Mesothelial Cells Enhances

Invasion of Endometrial Cells In a 3-Dimensional Model of Human Peritoneum. American Society for Reproductive Medicine Annual Meeting, 2006, New Orleans, LA, USA. *Fertil Steril*, 86, S86-S7.

NAIR, A. S., NAIR, H. B., et al. Modeling the early endometriotic lesion: mesothelium-endometrial cell co-culture increases endometrial invasion and alters mesothelial and endometrial gene transcription. ***Fertil Steril***, Dec 26, 2007.

NAP, A. W., DUNSELMAN, G. A., et al. Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the chicken chorioallantoic membrane model. ***Hum Reprod***, 19, 10, 2180-7, Oct, 2004.

NISOLLE, M. and DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. ***Fertil Steril***, 68, 4, 585-96, Oct, 1997.

ODA, S., NISHIMATSU, S., et al. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. ***Biochem Biophys Res Commun***, 210, 2, 581-8, May 16, 1995.

ORAL, E., OLIVE, D. L., et al. The peritoneal environment in endometriosis. ***Hum Reprod Update***, 2, 5, 385-98, Sep-Oct, 1996.

OSTEEN, K. G., BRUNER-TRAN, K. L., et al. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. ***Fertil Steril***, 83, 3, 529-37, Mar, 2005.

OTANI, T., MINAMI, S., et al. Immunohistochemical localization of activin A in human endometrial tissues during the menstrual cycle and in early pregnancy. ***Obstet Gynecol***, 91, 5 Pt 1, 685-92, May, 1998.

OTANI, T., MINAMI, S., et al. Production of activin A in hyperplasia and adenocarcinoma of the human endometrium. ***Gynecol Oncol***, 83, 1, 31-8, Oct, 2001.

PERALTA SOLER, A., KNUDSEN, K. A., et al. Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguishes mucinous from serous and endometrioid tumors. ***Hum Pathol***, 28, 6, 734-9, Jun, 1997.

PETRAGLIA, F., FLORIO, P., et al. Expression and secretion of inhibin and activin in normal and neoplastic uterine tissues. High levels of serum activin A

in women with endometrial and cervical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 83, 4, 1194-200, Apr, 1998.

PHILLIPS, D. J., JONES, K. L., et al. Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. **Mol Cell Endocrinol**, 180, 1-2, 155-62, Jun 30, 2001.

PONCELET, C., LEBLANC, M., et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. **Acta Obstet Gynecol Scand**, 81, 3, 195-203, Mar, 2002.

RAMOS, J. W., WHITTAKER, C. A., et al. Integrin-dependent adhesive activity is spatially controlled by inductive signals at gastrulation. **Development**, 122, 9, 2873-83, Sep, 1996.

REIS, F. M., DI BLASIO, A. M., et al. Evidence for local production of inhibin A and activin A in patients with ovarian endometriosis. **Fertil Steril**, 75, 2, 367-73, Feb, 2001.

ROMBAUTS, L., DONOGHUE, J., et al. Activin-A secretion is increased in the eutopic endometrium from women with endometriosis. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, 46, 2, 148-53, Apr, 2006.

SAMPSON. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol**, : 422-69, 14, 422-69, 1927.

SCHMITT, J., HOTTEN, G., et al. Structure, chromosomal localization, and expression analysis of the mouse inhibin/activin beta C (Inhbc) gene. **Genomics**, 32, 3, 358-66, Mar 15, 1996.

SCHNEYER, A., TORTORIELLO, D., et al. Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. **Mol Cell Endocrinol**, 180, 1-2, 33-8, Jun 30, 2001.

SCOTTI, S., REGIDOR, P. A., et al. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 6, 7, 610-7, Jul, 2000.

SPEROFF, L. and FRITZ, M. Endometriosis. In:SPEROFF L, F. M., **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. 7th. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1103 - 34

SPEROFF, L., GLASS, R., et al. Endometriosis. In:SPEROFF L, G. R., KASE N, **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. 6 ed. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1057-73

STARZINSKI-POWITZ, A., HANDROW-METZMACHER, H., et al. The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis?, **Mol Med Today**, 5, 7, 304-9, Jul, 1999.

STELLER, M. D., SHAW, T. J., et al. Inhibin resistance is associated with aggressive tumorigenicity of ovarian cancer cells. **Mol Cancer Res**, 3, 1, 50-61, Jan, 2005.

SULYOK, S., WANKELL, M., et al. Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. **Mol Cell Endocrinol**, 225, 1-2, 127-32, Oct 15, 2004.

TORRES, P. B., FLORIO, P., et al. Deranged expression of follistatin and follistatin-like protein in women with ovarian endometriosis. **Fertil Steril**, 88, 1, 200-5, Jul, 2007.

TSUCHIYA, B., SATO, Y., et al. Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. **Arch Histol Cytol**, 69, 2, 135-45, Jun, 2006.

WANG, H. Q., TAKEBAYASHI, K., et al. Follistatin-related gene (FLRG) expression in human endometrium: sex steroid hormones regulate the expression of FLRG in cultured human endometrial stromal cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 88, 9, 4432-9, Sep, 2003.

WELT, C., SIDIS, Y., et al. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. **Exp Biol Med (Maywood)**, 227, 9, 724-52, Oct, 2002.

WITZ, C. A. Pathogenesis of endometriosis. In: FRANCIS, T., **Endometriosis in Clinical Practice**. Andover, Hampshire, UK: Olive, D.L., 2005. 61-78

WITZ, C. A., ALLSUP, K. T., et al. Culture of menstrual endometrium with peritoneal explants and mesothelial monolayers confirms attachment to intact mesothelial cells. **Hum Reprod**, 17, 11, 2832-8, Nov, 2002a.

WITZ, C. A., CHO, S., et al. Time series analysis of transmesothelial invasion by endometrial stromal and epithelial cells using three-dimensional confocal microscopy. **Fertil Steril**, 79 Suppl 1, 770-8, Mar, 2003.

WITZ, C. A., CHO, S., et al. The alpha(2)beta(1) and alpha(3)beta(1) integrins do not mediate attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelium. **Fertil Steril**, 78, 4, 796-803, Oct, 2002b.

WITZ, C. A., DECHAUD, H., et al. An in vitro model to study the pathogenesis of the early endometriosis lesion. **Ann N Y Acad Sci**, 955, 296-307; discussion 40-2, 96-406, Mar, 2002c.

WITZ, C. A., MONOTOYA-RODRIGUEZ, I. A., et al. Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. **Fertil Steril**, 71, 1, 56-60, Jan, 1999.

WITZ, C. A., MONTTOYA-RODRIGUEZ, I. A., et al. Mesothelium expression of integrins in vivo and in vitro. **J Soc Gynecol Investig**, 5, 2, 87-93, Mar-Apr, 1998.

WITZ, C. A., TAKAHASHI, A., et al. Expression of the alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins at the surface of mesothelial cells: a potential attachment site of endometrial cells. **Fertil Steril**, 74, 3, 579-84, Sep, 2000.

WITZ, C. A., THOMAS, M. R., et al. Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. **Fertil Steril**, 75, 2, 385-90, Feb, 2001.

YOSHINAGA, K., INOUE, H., et al. N-cadherin is regulated by activin A and associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma. **Clin Cancer Res**, 10, 17, 5702-7, Sep 1, 2004.

YOSHINAGA, K., MIMORI, K., et al. Clinical significance of the expression of activin A in esophageal carcinoma. **Int J Oncol**, 22, 1, 75-80, Jan, 2003.

ZEITOUN, K., TAKAYAMA, K., et al. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. **J Clin Endocrinol Metab**, 83, 12, 4474-80, Dec, 1998.

ZEITVOGEL, A., BAUMANN, R., et al. Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. **Am J Pathol**, 159, 5, 1839-52, Nov, 2001.