

Pedro Xavier 2005

Aspectos morfofuncionais do endométrio normal e endometriótico

Estudo ultrasonográfico e biomolecular

Pedro Alexandre Fernandes Xavier

Aspectos morfofuncionais do endométrio normal e endometriótico

Estudo ultrasonográfico e biomolecular

Orientador: Doutor José Martinez de Oliveira
Co-orientador: Doutor Jorge Beires

Porto 2005

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

Artº 48º, § 3º - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.
(Regulamento da FMP, 29 de Janeiro de 1931 – Decreto nº 19337)

Corpo Catedrático
da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Professores Catedráticos:

Doutor Alexandre Guerra Sousa Pinto
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutor José Agostinho Marques Lopes
Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva
Doutor Daniel Filipe de Lima Moura
Doutor Belmiro dos Santos Patrício
Doutor Alberto Manuel Barros da Silva
Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante
Doutor José Henrique Dias Pinto de Barros
Doutora Maria de Fátima Machado Henriques Carneiro
Doutora Isabel Maria Amorim Pereira Ramos
Doutora Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira
Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira
Doutor Cassiano Pena de Abreu e Lima
Doutor Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira
Doutor Rui Manuel Almeida Mota Cardoso
Doutor António Carlos Freitas Ribeiro Saraiva
Doutor Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar
Doutor António José Pacheco Palha
Doutor Fernando Tavarela Veloso
Doutor José Luís Medina Vieira

Professores Jubilados e Aposentados:

Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina Silva Leal
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Daniel Santos Pinto Serrão
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Ferreira
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Menezes
Doutor João Silva Carvalho
Doutor Joaquim Oliveira Costa Maia
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Pinto de Barros
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Pedro Salgado Andrade Saraiva
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Francisco de Sousa Lé
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor Manuel António Moutinho Ribeiro
Doutor Mário Queirós Rebelo Carvalho
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

À Cristina

Ao Francisco
À Carolina

Aos meus pais
Aos meus irmãos

À minha sogra

Aos meus mestres

Prefácio 17

Abreviaturas 21

Capítulo 1. Introdução e definição de Objectivos 23

1.1. Introdução 24

1.2. Definição de objectivos 26

Capítulo 2. Endometriose. Da clínica à biologia molecular 31

2.1. Definição e dados epidemiológicos 32

2.1.1. Definição 32

2.1.2. Dados epidemiológicos 33

2.2. Evolução nos conceitos relativos à etiopatogénese 38

2.2.1. Teoria da menstruação retrógrada 39

2.2.2. Teoria da extensão directa 40

2.2.3. Teoria da metaplasia celómica 41

2.2.4. Teoria da Indução 42

2.2.5. Teoria dos restos embrionários 43

2.2.6. Teoria das metástases linfáticas e vasculares 44

2.3. Formas de apresentação 44

2.3.1. Endometriose ovárica 45

2.3.2. Endometriose nodular profunda ou do septo rectovaginal 48

2.3.3. Endometriose peritoneal 49

2.4. A fisiopatologia da endometriose à luz dos conhecimentos actuais no campo da biologia molecular 52

2.4.1. Implantação das células endometriais no mesotélio peritoneal 53

2.4.2. Sobrevivência e proliferação das células endometriais ectópicas 58

Capítulo 3. Estudo da vascularização endometrial com recurso à angiografia Doppler 87

3.1. Introdução e definição de objectivos 88

3.2. População e métodos 90

3.3. Resultados 97

3.4. Discussão 101

Capítulo 4. Estudo de marcadores séricos e plasmáticos ao longo do ciclo 115

4.1. Introdução e definição de objectivos 116
4.2. População e métodos 120
4.3. Resultados 125
4.3.1. Estradiol, Progesterona, FSH e LH 125
4.3.2. VEGF, TNF-α e Proteína C-reactiva 129
4.3.3. Caderina-E 132
4.3.4. CA 125 e CA 19-9 133
4.4. Discussão 138

Capítulo 5. Conclusões 159

Capítulo 6. Resumo, Summary 167
6.1. Resumo 168
6.2. Summary 170

Nesta dissertação foram utilizados trabalhos e resultados já publicados ou em publicação. Em obediência ao preceito legal (Decreto Lei nº 388/70, art. 8º, parágrafo 2) passo a citá-los:

1. Angiogénese folicular. Será a sua identificação importante para o tratamento da infertilidade?
   Pedro Xavier.
   Arquivos de Medicina 2000; 14(1):48-51.

2. Autoimmune progesterone urticaria.
   Vasconcelos C, Xavier P, Vieira AP, Martinho M, Rodrigues J, Bodas A, Barros MA, Mesquita-Guimarães J.
   Gynecological Endocrinology 2000; 14:245-7.

3. Avaliação prospectiva da taxa de gravidez após cirurgia laparoscópica em mulheres inférteis por endometriose.
   Xavier P, Rebelo C, Calejo L, Martinho M, Beires J, Bernardes J, Martinez-de-Oliveira J, Patrício B.
   Revista de Ginecologia e Medicina da Reprodução 2002; 27(1):63 (resumo).

4. Níveis séricos do VEGF em diferentes fases do ciclo menstrual.
   Xavier P, Gomes F, Pereira A, Teixeira-Pinto A, Beires J, Martinez-de-Oliveira J.
   Revista de Ginecologia e Medicina da Reprodução 2002; 27(1):74 (resumo).

5. Apoptose e Reprodução Humana.
   Pedro Xavier.
   Acta Médica Portuguesa 2002; 15(4):287-91.

6. Angiogenesis endometrial. ¿Qué valor tiene en el estudio de la endometriosis?
   Xavier P, Beires J, Belo L, Rebelo I, Martinez-de-Oliveira J.
   Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana 2004; 21:29-33.

7. Sub and endometrial blood flow in patients with endometriosis.
   Xavier P, Beires J, Martinez-de-Oliveira J.
   Human Reproduction 2004. 19(Suppl.1):i168 (abstract).

8. Endometriose. Diferentes formas de apresentação ou mais que uma doença?
Pedro Xavier.
Arquivos de Medicina 2004; 18(3):103-7.

9. A randomised study of GnRH antagonist (cetrorelix) versus agonist (busereline) for controlled ovarian stimulation. Effect on safety and efficacy.
Xavier P, Gamboa C, Calejo L, Silva J, Stevenson D, Nunes A, Martinez-de-Oliveira J.
European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2005 (no prelo).

10. Sub and intraendometrial blood flow along the menstrual cycle in patients with endometriosis.
Xavier P, Beires J, Barros H, Martinez-de-Oliveira J.
Fertility and Sterility 2005 (aceite para publicação).

11. Are we employing the most effective CA 125 and CA 19-9 cut-off values to detect endometriosis?
Xavier P, Beires J, Belo L, Rebelo I, Martinez-de-Oliveira J, Lunet N, Barros H.
European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2005 (aceite para publicação).

Os trabalhos foram subsidiados pelo projecto de investigação da Fundação para a Ciência e a Tecnologia: POCTI/CBO/46776/2002.

Prefácio

"The secret of the care of the patient is in caring for the patient"

Francis Weld

Quando há 11 anos atrás iniciei a minha actividade clínica sabia o quão importante seria fazer assentar a minha formação médica em bases sólidas que consagrassem uma componente assistencial consistente, capaz de permitir uma actuação adequada perante a doença e os doentes. Com o decorrer dos anos compreendi que a concretização deste propósito obrigava a uma interligação estreita entre a actividade clínica e uma vivência de reflexão e pesquisa científica. Essa interligação conduziu a uma tese de doutoramento cujos fundamentos se baseiam precisamente numa investigação científica aplicada a uma das mais complexas, mas simultaneamente das mais frequentes doenças do aparelho genital feminino: a endometriose. A realização de uma tese de doutoramento é, no entanto, uma tarefa árdua, dificilmente alcançável por uma só pessoa. Sem o apoio e a colaboração de muitas outras, a persistência, o sacrifício e o empenho que dediquei a esta obra não teriam sido suficientes para a sua concretização. É por esse motivo de toda a justeza, no momento que considero ser o mais adequado, deixar uma palavra de agradecimento a todos os que contribuíram, directa ou indirectamente, para a realização deste projecto.

Ao Doutor José Martinez de Oliveira, agradeço a sua orientação atenta, as suas palavras de estímulo e a sua conduta justa e afável. A confiança que sempre me transmitiu e as oportunidades que me concedeu ao longo destes anos, não apenas no âmbito do projecto mas também como meu Director do Serviço de Ginecologia, fazem do Doutor José Martinez de Oliveira uma figura incontornável na minha formação clínica e académica.

Ao Doutor Jorge Beires, estou-lhe profundamente agradecido pelos ensinamentos que me transmitiu na área da ecografia e que constituíram a base deste trabalho. Não posso deixar de sublinhar a permanente atenção e disponibilidade dedicadas a este projecto e, sobretudo, as várias provas de amizade que manifestou pela minha pessoa nos momentos mais difíceis deste percurso.

Ao Doutor Luís Pereira Leite, agradeço ter sido o mentor deste projecto e, em grande parte, mentor da minha carreira académica e assistencial. Foi o Doutor Luís Pereira Leite que em primeira instância me incentivou a realizar esta obra, mas mais do que isso, a sua postura de clínico humanista e docente dedicado constituiu um importante estímulo para que, ainda nos meus tempos de aluno, tivesse ficado entusiasmado pela área da Ginecologia e Obstetrícia.

Ao Doutor Belmiro Patrício, agradeço o apoio que sempre manifestou relativamente à minha pessoa e a este projecto, bem como a disponibilidade que me facultou para escrever esta tese com mais tranquilidade.

Ao Doutor Henrique Barros agradeço de uma forma sentida a colaboração na análise estatística dos dados, os importantes ensinamentos relativos a aspectos metodológicos de trabalhos de investigação e à correcta interpretação dos resultados encontrados. Agradeço também a sua amizade, o seu apoio e a oportunidade que me deu de testemunhar a sua conduta científica íntegra e de altíssima qualidade.

À Doutora Irene Rebelo e ao Doutor Luís Belo do Departamento de Bioquímica da Faculdade de

Farmácia da Universidade do Porto devo uma parte substancial desta obra. A dedicação extraordinária e o rigor na metodologia laboratorial foram garantias de qualidade que tive o privilégio de testemunhar ao longo de todo o trabalho. Para além do rigor científico não posso deixar de agradecer ao Doutor Luís Belo a disponibilidade que sempre patenteou para resolver problemas logísticos inerentes ao estudo.

Ao Doutor Nuno Montenegro agradeço os seus incentivos, a sua disponibilidade para com este projecto e para com a minha pessoa.

Ao Doutor João Bernardes estou reconhecido pelos ensinamentos que me transmitiu na área da endoscopia ginecológica e pela disponibilidade que sempre manifestou para colaborar no trabalho, nomeadamente na sua componente cirúrgica.

À Doutora Alexandra Matias agradeço a amizade e as manifestações de apoio e estímulo a que nunca se poupou.

À Dra. Adelina Nunes, à Dra. Cristina Gamboa e à Dra. Lucinda Calejo, agradeço a amizade, a saudável relação profissional e a disponibilidade que sempre manifestaram para colaborar com a minha actividade científica.

Ao Doutor Roberto Matorras Weinig, responsável pela Unidad de Reproducción Humana do Hospital de Cruces de Bilbao onde tive oportunidade de estagiar, agradeço alguns dos ensinamentos na área da Medicina da Reprodução e os conselhos relativos à investigação na área da endometriose.

Ao Dr. Carlos Alberto da Rocha estou reconhecido por ter sido um orientador do internato médico sempre atento, que me transmitiu valores na componente humana da nossa actividade profissional que não posso esquecer.

À Enfª Cláudia, à Enfª Maria José, à D. Leonor e à D. Paula, agradeço o trabalho suplementar a que foram obrigadas e as palavras afáveis para com as participantes no estudo.

Gostaria também de transmitir um agradecimento aos restantes elementos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de São João, particularmente àqueles que sempre se manifestaram solidários para com o meu trabalho.

Às doentes, razão de ser da Medicina, agradeço a colaboração, a disponibilidade e a confiança em mim depositada.

As últimas palavras são dirigidas à minha família, especialmente à Cristina, sem a ajuda da qual esta tese nunca teria tido lugar. A tolerância e compreensão perante muitas omissões familiares que este trabalho implicou fazem dela co-autora do mesmo. O incentivo que sempre me manifestou, especialmente nos momentos mais difíceis desta caminhada foi determinante para a concretização deste projecto.

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANP	"Atrial Natriuretic Peptide"
ARN	Ácido Ribonucleico
ASMR	"American Society for Reproductive Medicine"
Bax	"Bcl-2-associated X Protein"
Bcl	"B-cell CLL/Lymphoma 2"
Caderina-E	Caderina Epitelial
Caderina-N	Caderina Neuronal
Caderina-P	Caderina Placentária
CD	"Cluster of Definition"
EGF	"Epidermal Growth Factor"
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
FGF	"Fibroblast Growth Factor"
FSH	"Follicle Stimulating Hormone"
ICAM	"Intercellular Adhesion Molecule"
IL	Interleucina
ILGF	"Insulin-Like Growth Factor"
LH	"Luteinizing Hormone"
MMPs	"Matrix Metaloproteinases"
NK	"Natural Killer"
PAF	"Platet Activating Factor"
ROC	"Receiver Operating Characteristic"
TGF	"Transforming Growth Factor"
TIMPs	"Tissue Inhibitors of Matrix Metaloproteinases"
TNF	"Tumor Necrosis Factor"
TUNEL	"Transferase Mediated dTUP Nick End Labeling"
VCAM	"Vascular Cell Adhesion Molecule"
VEGF	"Vascular Endothelial Growth Factor"
VEGFR	"Vascular Endothelial Growth Factor Receptor"
VIP	"Vasoactive Intestinal Peptide"

CAPÍTULO 1

Introdução e definição de objectivos

1.1. Introdução

Numerosos estudos científicos dedicados à endometriose são objecto de publicação anual nas mais prestigiadas revistas mundiais de diferentes áreas da Medicina (Ginecologia, Epidemiologia, Biologia Celular e Molecular, Genética e Imunologia, para citar apenas as mais frequentemente envolvidas). Apesar deste esforço investigacional e da reflexão que obviamente condiciona, continuam por clarificar os mecanismos fisiopatológicos desta doença. Do ponto de vista teórico este desconhecimento resulta numa proliferação de teorias, que no entanto se mostram incapazes de explicar todas as formas de aparecimento e manifestação da doença. Do ponto de vista prático as implicações deste desconhecimento são ainda mais graves, uma vez que implicam o aparecimento de múltiplas propostas terapêuticas, algumas das quais sem fundamento científico adequado e, na maior parte dos casos, totalmente ineficazes para a resolução do problema das doentes.

Apesar de estarmos ainda longe de conhecer com rigor todos os circuitos fisiopatológicos que conduzem ao aparecimento da endometriose, admite-se que a capacidade intrínseca das células endometriais em algumas mulheres de aderirem e invadirem o mesotélio, ou seja, de nele se implantarem, aliada à variabilidade da resposta imunológica e à falência dos mecanismos homeostáticos de regulação da população celular, poderão constituir aspectos decisivos no estabelecimento inicial e posterior desenvolvimento da endometriose (**Oosterlynck e col. 1991; Taylor e col. 1997; Mclaren e col. 1997; Braun e Dmowski 1998; Witz 1999; Lebovic e col. 2001; Dmowski e col. 2001; Xavier 2002; Seli e col. 2003**). Pressupõe-se que as mulheres com um défice local de certas funções imunológicas seriam incapazes de erradicar os implantes de endométrio ectópico, ao mesmo tempo que o excesso de fenómenos angiogénicos (promovendo a neovascularização) e a fraca expressão de factores pró-apoptóticos (promovendo a sobrevivência celular) no endométrio de mulheres afectadas facilitaria a implantação, proliferação e desenvolvimento das células endometriais fora da cavidade corporal uterina. Por outras palavras, o endométrio de mulheres destinadas a desenvolver a endometriose poderá ter uma maior capacidade para se implantar, proliferar e desenvolver na cavidade peritoneal (**Donnez e col. 1998; Healy e col. 1998; Fasciani e col. 2000; Xavier e col. 2004a**).

A clarificação da fisiopatologia da endometriose, para além de constituir uma premissa essencial para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento que se revelem mais eficazes que as actualmente disponíveis, é também fundamental para melhorar a

compreensão dos achados de exames complementares não invasivos habitualmente utilizados no seu estudo. Um destes exemplos é a ultrasonografia, actualmente o método imagiológico de primeira linha na avaliação da endometriose (**Mais e col. 1993; Volpi e col. 1995; Dogan e col. 1996; Patel e col. 1999; Brosens e col. 2003**). Se por um lado a introdução na prática clínica das sondas endovaginais permitiu melhorar a definição morfológica dos órgãos pélvicos com especial ênfase para o endométrio (**Böhm-Velez e Mendelson 1992; Fleischer e col. 1997**), esta avaliação morfológica foi entretanto enriquecida com a possibilidade do estudo hemodinâmico, após a incorporação, neste tipo de sondas, da tecnologia Doppler, sobretudo após o advento da codificação de cores com a técnica de Doppler a cores e o power Doppler, também designado por angiografia Doppler (**Kurjak e col. 1997**). Com base nesta tecnologia foi já possível definir os padrões da arquitectura vascular do ovário ao longo do ciclo menstrual (**Beires 1999**), o que permitiu confirmar a ultrasonografia como um meio capaz de efectuar, neste órgão reprodutivo, um estudo simultaneamente morfológico e funcional, ou seja morfofuncional. Na área da infertilidade a angiografia Doppler tem sido já utilizada para efectuar a avaliação morfofuncional do endométrio, designadamente no estudo da relação entre a sua perfusão sanguínea e a sua receptividade (**Yang e col. 1999; Contart e col. 2000; Kupesic e col. 2001; Chien e col. 2002**). A aplicação deste conceito ao estudo da vascularização endometrial em mulheres com endometriose constitui um desafio empolgante, uma vez que não há, nesta área, estudos científicos consistentes.

A necessidade de consolidar a hipótese fisiopatológica da disfunção endometrial, nomeadamente a hipótese do maior potencial angiogénico do endométrio de mulheres com endometriose, aliada ao facto de ser hoje tecnicamente possível definir a vascularização endometrial e subendometrial por meio da ultrasonografia transvaginal e angiografia Doppler, justificam, no nosso entender, o estudo dessa perfusão sanguínea nas doentes com endometriose. A aplicação dessa tecnologia ao endométrio poderá permitir a detecção de fenómenos de vascularização excessiva, eventualmente relacionados com o desenvolvimento da doença, ou seja, permitir uma verdadeira avaliação morfofuncional (**Xavier e col. 2004b**). Por outro lado, consideramos oportuno o estudo no meio circulatório sistémico dessas doentes de factores biomoleculares com propriedades angiogénicas, inflamatórias e de adesividade celular. Os resultados desse estudo poderão permitir consolidar a hipótese da endometriose como entidade associada a uma actividade angiogénica excessiva e a uma desregulação da actividade inflamatória e da adesividade celular que contribuem para o desencadear de uma cascata de eventos, resultando em última análise no estabelecimento da doença em toda a sua plenitude.

1.2. Definição de Objectivos

A tese que nos propusemos realizar procura contribuir para a clarificação dos mecanismos etiopatogénicos da endometriose, assentando para tal numa base essencialmente clínica, na qual o estudo da vascularização endometrial por meio da ultrasonografia com angiografia Doppler em mulheres com endometriose se assume como fulcro principal. No entanto, uma vez que considerámos indispensável sustentar os achados clínicos com fundamentos fisiopatológicos, realizámos uma investigação de âmbito biomolecular, na qual estudámos a actividade ao nível sérico de factores com propriedades angiogénicas, inflamatórias, de regulação da população e da adesão celular, em doentes com endometriose e em mulheres sãs. Finalmente pretendemos avaliar o valor diagnóstico dos níveis plasmáticos de dois marcadores tumorais quando aplicados à detecção da endometriose.

O nosso trabalho teve assim por objectivos:

1. Dar um contributo para a definição dos padrões de arquitectura vascular endometrial ao longo do ciclo menstrual, tanto em mulheres sãs como em doentes com endometriose, recorrendo para tal à utilização da ultrasonografia transvaginal e angiografia Doppler.

2. Determinar, ao longo do ciclo menstrual, os níveis séricos do "vascular endothelial growth factor" (VEGF) (propriedades predominantemente angiogénicas), do "tumor necrosis factor-alfa" (TNF-α) (propriedades angiogénicas, inflamatórias, de regulação da população e da adesão celular), da proteína C-reactiva (marcador de inflamação) e da caderina epitelial (caderina-E) (propriedades predominantemente de adesão celular), em doentes com endometriose comparando-os com os de mulheres saudáveis.

3. Estabelecer o valor como teste de diagnóstico do doseamento dos níveis plasmáticos dos determinantes antigénicos associados a tumores OC 125 (CA 125) e 1116-NS-19-9 (CA 19-9) na detecção da endometriose.

4. Avaliar o interesse clínico e o impacto assistencial deste estudo em doentes com endometriose.

Referências

Beires J. Avaliação Doppler do fluxo sanguíneo ovárico. Padrões de arquitectura vascular ao longo do ciclo. (Dissertação de Doutoramento), Faculdade de Medicina do Porto 1999.

Böhm-Vélez M, Mendelson EB. Transvaginal Sonography: Applications, Equipment, and Technique. In Nyberg David A, Hill Lyndon M, Böhm-Vélez M, et al. Transvaginal Ultrasound. Mosby Year Book, 1992: 1-20.

Braun DP, Dmowski WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. Curr Opin Obstet Gynecol 1998; 10:365-9.

Brosens J, Timmerman D, Starzinski-Powitz A, Brosens I. Noninvasive diagnosis of endometriosis: the role of imaging and markers. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:95-114.

Chien L, Au H, Chen P, Xiao J, Tzeng C. Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 2002; 78:245-51.

Contart P, Baruffi RL, Coelho J, Mauri AL, Peterson C, Franco JG Jr. Power Doppler endometrial evaluation as a method for the prognosis of embryo implantation in an ICSI program. J Assist Reprod Genet 2000; 17:329-34.

Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. Hum Reprod 2001; 16:1802-8.

Dogan MM, Ugur M, Soysal SK, Soysal ME, Ekici E, Gokmen O. Transvaginal sonographic diagnosis of ovarian endometrioma. Int J Gynaecol Obstet 1996; 52:145-9.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998; 13:1686-90.

Fasciani A, D'Ambrogio G, Bocci G, Monti M, Genazzani AR, Artini PG. High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata. Mol Hum Reprod 2000; 6:50-4.

Fleischer AC, Applebaum MI, Parsons AK. Transvaginal sonography of the normal endometrium. In: Fleischer AC, Kurjak A, Granberg S. Ultrasound and the endometrium. The Parthenon Publishing Group, 1997: 1-16.

Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. Hum Reprod Update 1998; 4:736-40.

Kupesic S, Bakavac I, Bjelos D, Kurjak A. Assessment of endometrial receptivity by transvaginal color

Doppler and three-dimensional power Doppler ultrasonography in patients undergoing in vitro fertilization procedures. J Ultrasound Med 2001; 15:89-94.

Kurjak A, Kupesic S, Babic MM. Color Doppler assessment of endometrial blood flow. In: Fleischer AC, Kurjak A, Granberg S. Ultrasound and the endometrium. The Parthenon Publishing Group, 1997: 87-96.

Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. Fertil Steril 2001; 75:1-10.

Mais V, Guerriero S, Ajossa S, Angiolucci M, Paoletti AM, Melis GB. The efficiency of transvaginal ultrasonography in the diagnosis of endometrioma. Fertil Steril 1993; 60:776-80.

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

Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. Fertil Steril 1991; 56:45-61.

Patel MD, Feldstein VA, Chen DC, Lipson SD, Filly RA. Endometriomas: diagnostic performance of US. Radiology 1999; 210:739-45.

Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:41-61.

Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF. Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. Ann NY Acad Sci 1997; 828:194-207.

Volpi E, De Grandis T, Zuccaro G, La Vista A, Sismondi P. Role of transvaginal ultrasonography in the detection of endometriomata. J Clin Ultrasound 1995; 23:163-7.

Xavier P. Apoptose e reprodução humana. Acta Med Port 2002; 15:287-91.

Xavier P, Beires J, Belo L, Rebelo I, Martinez-de-Oliveira J. Angiogénesis endometrial. ¿Qué valor tiene en el estudio de la endometriosis? Rev Iberoam Fértil & Reprod Hum 2004a; 21:29-33.

Xavier P, Beires J, Martinez-de-Oliveira J. Sub and endometrial blood flow in patients with endometriosis. Hum Reprod 2004b; 19(Suppl.1):i168.

Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. Clin Obstet Gynecol 1999; 42:566-85.

Yang JH, Wu MY, Chen CD, Jiang MC, Ho HN, Yang YS. Association of endometrial blood flow as determined by a modified color Doppler technique with subsequent outcome on in-vitro fertilization. Hum Reprod 1999; 14:1606-10.

CAPÍTULO 2

Endometriose. Da clínica à biologia molecular

2.1. Definição e e dados epidemiológicos

2.1.1. Definição

A endometriose, entidade clínica descrita pela primeira vez há mais de 100 anos, pode ser definida como a presença de tecido endometrial funcionante (glândulas e estroma) implantado fora da cavidade corporal uterina. Esse tecido endometrial ectopicamente implantado é habitualmente designado por foco de endometriose e tem como localização mais comum a cavidade pélvica (Figura 2.1). A presença de lesões de endometriose extra-pélvica, embora menos frequente, tem sido amplamente referida (**Foster e col. 1981; van Schil e col. 1996; Jubanyik e Comite 1997; Coimbra e col. 2000**).

Os sintomas associados a esta entidade resultam da hemorragia cíclica que ocorre a partir das lesões para os tecidos adjacentes, conduzindo ao aparecimento de uma reacção inflamatória mais ou menos extensa e em última análise à formação de aderências e distorções anatómicas (**Missmer e Cramer 2003**).

A definição de endometriose acima descrita, embora amplamente consagrada, encerra em si mesmo questões ainda por resolver e cuja repercussão sobre a forma como se diagnostica e se estuda a doença não pode ser menosprezada.

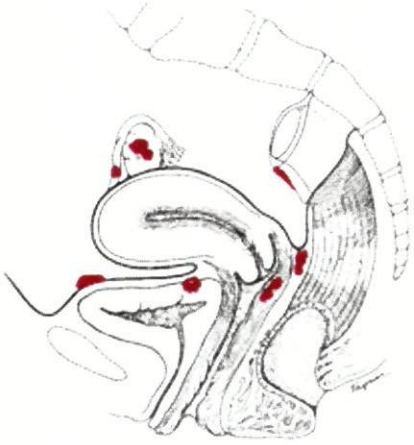


Figura 2.1: Localizações mais comuns das lesões de endometriose pélvica (Adaptado de Hornstein e Barbieri. Endometriosis. In: Ryan KJ, Berkowitz RS, Barbieri RL, editors. Kistner's Gynecology and women's health. St. Louis: Mosby; 1999: 495).

Uma das limitações mais importantes que esta definição condiciona é, desde logo, o facto do diagnóstico definitivo de endometriose só ser possível realizar após a demonstração da presença de glândulas e / ou estroma endometrial em localização ectópica, obrigando quase sempre à realização de uma cirurgia. Por outro lado, é possível estabelecer este diagnóstico numa mulher assintomática, em que o achado de lesões ocorre de uma forma perfeitamente casual e secundária a uma intervenção cirúrgica realizada por outro motivo. Esta última consideração é suportada pelo resultado de diferentes estudos, segundo os quais a prevalência do achado de endometriose em mulheres assintomáticas durante a realização de uma esterilização cirúrgica pode variar entre 2% e 43% (**Strathy e col. 1982; Kirshon e Poindexter 1989; Moen e Stokstad 2002**). No entanto, uma entidade clínica quando analisada numa perspectiva de saúde pública só adquire relevo se provoca sintomas ou resulta em morbilidade com impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos na qual é diagnosticada. Este é o motivo que leva alguns ginecologistas a sugerir que o diagnóstico de endometriose deva ser definido, não apenas pela presença de endométrio ectópico, mas também pela evidência de que as lesões são activas, ou seja, são responsáveis por sintomas de dor pélvica, de infertilidade e / ou pela presença de uma tumefacção anexial (**Audebert e col. 1992**). Alguns autores, não sem polémica, vão mesmo ao ponto de sugerir que, uma vez que as formas de endometriose mínima ou ligeira podem ocorrer intermitentemente em todas as mulheres, não devem ser consideradas uma doença (**Koninckx 1994; Evers 1994**).

É óbvio que esta polémica reflecte as discordâncias que a endometriose desperta na comunidade científica, não apenas nos aspectos clínicos, relacionados com as modalidades de diagnóstico e as opções terapêuticas, mas sobretudo nos aspectos relativos à metodologia que deve ser seguida num trabalho de investigação, particularmente em estudos caso-controlo. De acordo com **Holt e Weiss (2000)**, a estratégia de selecção dos casos para estudo de doentes com endometriose deve obedecer ao critério da presença de lesões celularmente activas, nas quais se incluem as doentes com dor pélvica, infertilidade não atribuível a outras causas, presença de lesões infiltrativas ou de endometriomas. Deste modo, a recomendação de excluir de estudos caso-controlo as mulheres assintomáticas e sem lesões activas, mesmo que susceptíveis de diagnóstico anátomo-patológico de endometriose, é uma consequência natural (**Holt e Weiss 2000; Zondervan e col. 2002**).

2.1.2. Dados Epidemiológicos

Uma alta taxa de morbilidade e enormes custos sociais resultam da associação entre

a endometriose, a dor pélvica crónica e a infertilidade, apesar de continuar por esclarecer a verdadeira prevalência, incidência e factores de risco para esta doença (**Missmer e Cramer 2003**). Esta limitação resulta do facto de poucos estudos epidemiológicos terem sido realizados até ao momento, desde logo porque a especificidade desta doença, nomeadamente no que diz respeito aos critérios de diagnóstico já atrás discutidos, levanta problemas metodológicos de difícil resolução para um correcto desenho desses estudos.

a. Prevalência

Estimativas resultantes de estudos realizados nos Estados Unidos apontam para uma prevalência da endometriose da ordem dos 7% nas mulheres em idade reprodutiva (**Hornstein e Barbieri 1999**). Quando considerada a população de mulheres admitidas em instituições hospitalares por dor pélvica, o valor da prevalência variou entre os 5 e os 21% (**Liston e col. 1972; Kleppinger 1974; Hasson 1976**). Na população infértil é ainda mais elevada, podendo variar, segundo diferentes estudos, entre os 5 e os 50% (**Peterson e Behrman 1970; Liston e col. 1972; Kleppinger 1974; Hasson 1976; Hornstein e Barbieri 1999**). As adolescentes, particularmente as que apresentam dor pélvica crónica sob a forma de dismenorreia grave, constituem um grupo onde a prevalência pode atingir valores entre os 45 e os 70% (**Laufer e col. 1997; Propst e Laufer 1999**). A aplicação destes conhecimentos à prática clínica permite identificar os grupos de maior risco de endometriose, aumentando dessa forma o índice de suspeição para o seu diagnóstico, ao mesmo tempo que diminui o intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo. Este facto reveste-se de uma clara importância fundamentalmente por dois motivos: por um lado possibilita o estabelecimento de uma estratégia terapêutica mais precoce, por outro, aumenta a eficácia de estratégias preventivas da progressão das lesões, de utilidade inquestionável sobretudo na população de adolescentes.

b. Incidência

Se a estimativa da prevalência da endometriose tem grandes limitações, o cálculo da incidência é ainda mais complexo. Num dos poucos trabalhos onde é abordada esta questão de uma forma sustentada, **Houston (1984)** estimou que, entre 1970 e 1979, a incidência de endometriose confirmada histologicamente numa população de mulheres de raça branca com idades compreendidas entre os 15 e os 45 anos e residentes no Minnesota era de 160 por

100.000 mulheres por ano. Essa incidência variou com a idade, oscilando de 17 por 100.000 mulheres por ano entre os 15 e os 19 anos, para 285 por 100.000 mulheres por ano entre os 40 e os 44 anos, voltando a descer para 184 por 100.000 mulheres por ano entre os 45 e os 49 anos de idade (**Houston 1984**). Estes dados vêm ao encontro da noção generalizada de que a endometriose é uma doença que afecta a mulher desde a adolescência até ao período de pós-menopausa imediata, estando esta distribuição etária seguramente relacionada com factores hormonais endógenos.

c. Factores de risco

No que diz respeito aos factores de risco, algumas observações consistentes têm emergido dos estudos completados até à data (Tabelas 2.1 e 2.2) (**Missmer e Cramer 2003**).

Factores associados a um maior risco de endometriose		
Menstruais e reprodutivos	**Constitucionais**	**Ambientais**
Menarca precoce	Factores genéticos	Exposição ao álcool
Interlúnios de curta duração	Alta estatura	Exposição à cafeína
Fluxo menstrual abundante	Pêlo de cor ruiva	Exposição a dioxinas
Nuliparidade	Raça branca	

Tabela 2.1: Quadro representativo dos principais factores reconhecidamente associados a um risco aumentado para o desenvolvimento de endometriose.

Factores associados a um menor risco de endometriose		
Menstruais e reprodutivos	**Constitucionais**	**Ambientais**
Multiparidade	Aumento do IMC	Exercício físico regular
Utilização de contraceptivos orais		Hábitos tabáquicos

Tabela 2.2: Quadro representativo dos principais factores reconhecidamente associados a um risco diminuído para o desenvolvimento de endometriose (IMC = índice de massa corporal).

Os factores menstruais e reprodutivos são aqueles que mais frequentemente têm sido associados à endometriose. Esta associação resulta da hipótese, desde há muitos anos reconhecida, de que o crescimento e diferenciação dos implantes endometriais ectópicos é hormono-dependente (**Witz 1999**). A identificação de receptores de estrogénio e de progesterona nesse endométrio ectópico serve de suporte a essa teoria (**Lessey e col. 1989; Prentice e col. 1992; Bergqvist e col. 1993; Nisolle e col. 1997**), embora se admita que a sensibilidade desse tecido à acção da progesterona possa estar alterado.

Para além dos factores estritamente hormonais, todas as situações que contribuam para o aumento do número de células endometriais transportadas para a cavidade pélvica ao longo da vida são consideradas potenciadoras do risco de desenvolvimento de endometriose. Nesta linha de raciocínio incluem-se a menarca precoce, os interlúnios de curta duração, o fluxo menstrual abundante e a nuliparidade (**Cramer e col. 1986; Matorras e col. 1995; Sangi-Haghpeykar e Poindexter 1995; Arumugan e Lim 1997; Eskenazi e Warner 1997; Missmer e Cramer 2003**). A multiparidade, pelo contrário, foi apontada como protectora, mesmo tendo em conta o possível enviesamento resultante do facto da paridade das mulheres com endometriose poder ser influenciada pela maior prevalência de infertilidade (**Sangi-Haghpeykar e Poindexter 1995**). Cada gravidez reduziria o número de meses nos quais a mulher estaria exposta à menstruação durante a sua vida, diminuindo, dessa forma, a exposição da cavidade pélvica às células endometriais (**Sangi-Haghpeykar e Poindexter 1995**). Por outro lado, a dilatação do canal cervical secundária ao parto eutócico, seria outro factor protector ao permitir uma melhor drenagem do fluxo menstrual. Da mesma forma, o uso de contraceptivos orais diminuiria o risco de desenvolvimento de endometriose (**Missmer e Cramer 2003**), em consequência da redução do fluxo menstrual que caracteristicamente se lhes associa, uma vez que a cavidade pélvica estaria exposta a um menor número de células endometriais ectópicas (**Sangi-Haghpeykar e Poindexter 1995; van der Linden e col. 1996; Eskenazi e Warner 1997**). A diminuição do número de mutações monoclonais, resultante da inibição da ovulação, seria mais um factor contributivo para a redução desse risco. Outro argumento importante para sustentar a redução do risco de endometriose nas mulheres medicadas com contraceptivos orais baseia-se nas teorias que defendem a necessidade da existência de defeitos da integridade do epitélio de superfície do peritoneu e do ovário para que ocorra a implantação das células endometriais ectópicas (**van der Linden e col. 1996**). A ovulação incessante, ao provocar uma maior extensão desses defeitos no epitélio de superfície do ovário, aumentaria a exposição do córtex ovárico à adesão das células endometriais, ocorrendo o fenómeno inverso nas mulheres em que a ovulação se encontra inibida. Apesar de serem apelativos os indícios apresentados em favor de uma

diminuição do risco de endometriose associado ao uso dos contraceptivos orais, foi possível encontrar argumentos com sentido contrário. **Barbieri (1998)** defendeu que a exposição aos estrogénios sintéticos, mesmo que em baixas doses, pode aumentar o risco de implantação e desenvolvimento das lesões de endometriose. Apesar desta controvérsia, continua a ser generalizada a utilização dos contraceptivos orais na profilaxia e tratamento das formas leves de endometriose, motivo pelo qual se aguarda com expectativa os resultados de novas investigações sobre esta matéria.

Relativamente aos factores constitucionais, é um dado adquirido desde há longa data que algumas mulheres podem ter uma predisposição genética para o desenvolvimento de endometriose. **Simpson e col. (1980)** determinaram que o risco de uma familiar do primeiro grau de uma doente com endometriose poder vir a desenvolver a doença é de cerca de 7%, ao passo que esse risco seria de apenas 1% no grupo de controlo, constituído, nesse estudo, pelas parentes do mesmo grau do marido da respectiva doente. Em concordância com estes resultados estão as observações de uma maior concordância nas gémeas monozigóticas do que nas dizigóticas (**Moen 1994; Kennedy e col. 1995**). O modo mais provável de transmissão é o de hereditariedade poligénica e multifactorial e não o da hereditariedade mendeliana (**Propst e Laufer 1999; Simpson e col. 2003**). O número e os genes envolvidos não estão ainda totalmente determinados. Relativamente ao peso e ao índice de massa corporal, uma relação inversa com o risco de desenvolvimento de endometriose foi já estabelecida (**Cramer e col. 1986; Darrow e col. 1993; Signorello e col. 1997**). A explicação avançada para este achado baseou-se na constatação de uma maior incidência de ciclos ovulatórios nas mulheres de alta estatura e baixo índice de massa corporal quando comparadas com as mulheres obesas (**Dorgan e col. 1995**). Esta diferença teria duas consequências capazes de influenciar o risco de desenvolvimento de endometriose. Por um lado, a maior incidência de ciclos ovulatórios associar-se-ia a um maior nível de hormonas ováricas na corrente sanguínea (**Dorgan e col. 1995**). Por outro lado, do fenómeno de ovulação incessante resultaria uma maior extensão de defeitos no epitélio de superfície do ovário, aumentando desse modo a exposição do córtex ovárico à adesão dessas células endometriais (**van der Linden e col. 1996**). Segundo este autor, nas mulheres com ciclos ovulatórios regulares, o córtex do ovário seria o local preferencial de desenvolvimento e progressão da endometriose. Estudos observacionais permitiram também estabelecer uma relação directa entre o risco aumentado de endometriose, o pêlo ruivo e a raça branca, em contraposição com a raça negra (**Houston 1984; Sangi-Haghpeykar e Poindexter 1995; Eskenazi e Warner 1997**).

Desde a década de 80 que determinados aspectos do estilo de vida da mulher

contemporânea, bem como a exposição a certos factores ambientais têm sido relacionados com o risco de desenvolvimento de endometriose. A associação com o hábito tabáquico é o paradigma dessa relação (**Cramer e col. 1986; Vessey e col. 1992; Darrow e col. 1993; Matorras e col. 1995**). **Cramer e col. (1986)** constataram que as mulheres fumadoras de pelo menos vinte cigarros por dia apresentavam um risco diminuído de endometriose. Esse menor risco resultaria, segundo estes autores, de um menor nível de estrogénios circulantes na sua forma livre, uma vez que o tabaco aumenta os níveis da globulina de transporte das hormonas sexuais. **Vessey e col. (1993)** não puderam, no entanto, confirmar esses achados. Num estudo efectuado em mais de 17 mil mulheres que frequentavam clínicas de medicina familiar, não encontraram qualquer alteração do risco nas mulheres fumadoras. Esta controvérsia leva-nos a introduzir as dioxinas na discussão sobre os factores de risco para endometriose. Produto da poluição ambiental, a exposição às dioxinas foi pela primeira vez implicada no aumento do risco de endometriose em macacas Rhesus, aparentemente devido ao seu efeito imunossupressor (**Rier e col. 1993**). Mais recentemente foi apontada como possível factor de risco na espécie humana (**Pauwels e col. 2001; Eskenazi e col. 2002**). Estima-se que um indivíduo fumador de vinte cigarros por dia esteja exposto a cerca 4,3 pg/Kg de peso/dia de dioxinas, sob a forma de dibenzodioxina policloronada (**Missmer e Cramer 2003**). Dessa forma, nas mulheres fumadoras, o efeito final do uso do cigarro no risco de desenvolvimento de endometriose não está ainda totalmente clarificado, uma vez que resulta do balanço entre a menor exposição aos estrogénios e a maior exposição às dioxinas. Mais consistente é a associação entre o risco de desenvolvimento da doença e o consumo de álcool e de cafeína ou a prática de exercício físico regular. Enquanto que as mulheres com esse tipo de actividade física têm um risco diminuído, no caso do consumo de álcool e de cafeína esse risco estará aumentado (**Grodstein e col. 1994; Abdalla e Rizk 1998**).

2.2. Evolução nos conceitos relativos à etiopatogénese

"Apesar da endometriose ter sido descrita detalhadamente há mais de 100 anos, continua a ser uma das doenças do aparelho genital feminino de mais difícil compreensão e resolução".

Esta afirmação é já considerada um "lugar comum" na introdução de qualquer documento que tenha por objectivo fazer uma abordagem aos aspectos fisiopatológicos da entidade clínica à qual se atribuiu a designação de endometriose. A complexidade etiopatogénica que caracteriza esta doença justifica o aparecimento, ao longo de várias décadas, de múltiplas teorias que se propõem explicar os mecanismos que estão na base do desenvolvimento das lesões de endometriose.

2.2.1. Teoria da menstruação retrógrada

Também conhecida por teoria da implantação ou de Sampson, foi proposta pela primeira vez por este autor em 1927 (**Brosens 1993**). Defende que a endometriose é secundária à regurgitação de tecido endometrial viável através dos oviductos durante o período menstrual, com implantação e proliferação subsequente deste tecido na superfície peritoneal ou nos órgãos pélvicos (**Brosens 1993**). Esta teoria baseia-se em três premissas: a primeira é a admissão da existência de menstruação retrógrada através dos oviductos; a segunda é a de que o tecido endometrial regurgitado é viável na cavidade peritoneal; a terceira é a de que as células regurgitadas são capazes de aderir ao peritoneu, de nele se implantarem e posteriormente de o invadirem e nele proliferarem (**Seli e col. 2003**). Vários autores demonstraram a veracidade da primeira premissa através da identificação do fenómeno da menstruação retrógrada em procedimentos cirúrgicos pélvicos realizados durante o período menstrual. Nas séries de **Halme e col. (1984)** e de **Liu e Hitchcock (1986)**, a prevalência deste fenómeno, mesmo em mulheres sem endometriose, atingiu valores quase universais, respectivamente de 90% e 76%. A demonstração da viabilidade das células endometriais regurgitadas surgiu mais tarde com a cultura bem sucedida dessas células obtidas directamente do sangue catamenial (**Keettel e Stein 1951**) ou do líquido peritoneal (**Beyth e col. 1975; Nagel e col. 1984; Mungyer e col. 1987; Kruitwagen e col. 1991**). A sustentação mais definitiva desta teoria foi obtida com a demonstração de que as células endometriais, uma vez alcançada a cavidade peritoneal, eram capazes de se implantar e originar lesões de endometriose. Esta demonstração foi primeiramente levada a cabo no modelo animal por Scott e TeLinde, ainda na década de 50, através da observação de que a disseminação artificial de células endometriais no peritoneu de babões resultava no desenvolvimento de implantes de endometriose em 50% dos casos (**Seli e col. 2003**). **Ridley e Edwards (1958)** efectuaram uma experiência semelhante, neste caso na espécie

humana, que consistiu na injecção de sangue menstrual no tecido subcutâneo da parede abdominal de doentes, 90 a 180 dias antes de se submeterem a uma intervenção cirúrgica por indicação ginecológica. Nessa altura o local da injecção foi excisado para exame histológico, tendo então sido possível identificar a presença de glândulas e estroma endometrial, reforçando dessa forma a convicção de que o tecido ectópico viável é capaz de se implantar e desenvolver. Este fenómeno explicaria o achado de lesões iatrogénicas de endometriose no trajecto de agulha de amniocentese (**Kaunitz e Di Sant'Agnese 1979**), em cicatrizes de episiotomia (**Wittich 1982**) ou, mais vulgarmente, em cicatrizes de cesariana (**Rovito e Gittleman 1986**). Dessa forma, a demonstração "in vitro" de que o endométrio é capaz de aderir à superfície do mesotélio peritoneal, por intermédio das células do estroma, representa uma sustentação importante da teoria da menstruação retrógrada como fonte das células endometriais para a adesão ao peritoneu (**Witz e col. 1999**). A constatação de um risco aumentado de endometriose em doentes com anomalias müllerianas que resultem no obstáculo ao fluxo menstrual através do colo e da vagina (**Sanfilippo e col. 1986; Olive e col. 1987**) constitui igualmente um dado a favor do modelo da menstruação retrógrada. Por outro lado, as mulheres afectadas pela doença têm uma maior prevalência de ciclos menstruais de curta duração e simultaneamente uma maior duração e intensidade do fluxo menstrual (**Cramer e col. 1986**). Finalmente, o facto das lesões de endometriose encontradas na cavidade pélvica terem uma distribuição preferencial pelas áreas pendentes, vai de encontro à hipótese da deposição do sangue menstrual regurgitado nesses locais (**Jenkins e col. 1986**). Embora no complexo processo de estudo da etiopatogénese da endometriose a teoria da menstruação retrógrada seja ainda hoje a de maior aceitação junto da comunidade científica e clínica, ela encerra em si mesmo uma limitação explicativa que nunca foi capaz de ultrapassar. Se a menstruação retrógrada é um fenómeno praticamente universal, a questão que sistematicamente fica sem resposta é a de saber porquê só algumas mulheres desenvolvem a doença. A procura de resposta para esta questão constitui provavelmente o maior estímulo para as numerosas equipas de investigação que actualmente se dedicam ao estudo desta entidade.

2.2.2. Teoria da extensão directa

A progressão directa do endométrio eutópico através da musculatura uterina, da qual resultaria o desenvolvimento da endometriose, constitui a proposta apresentada por Cullen em 1908 e que está na base deste teoria (**Seli e col. 2003**). Para além de ter demonstrado a

presença de elementos glandulares, característicos de epitélio endometrial, em localização ectópica, Cullen constatou que em 55 de 56 casos estudados existia uma continuidade directa desses elementos com o endométrio eutópico. A semelhança entre este mecanismo etiopatogénico proposto para explicar o desenvolvimento das lesões de endometriose e o já então descrito para a adenomiose, esteve na base da designação inicial de adenomiose externa (**Seli e col. 2003**). A questão que entretanto se colocou foi a da legitimidade da aplicação desta teoria, aparentemente pacífica no caso da adenomiose, ao desenvolvimento da endometriose. Actualmente, apesar do reconhecimento da capacidade de crescimento, por um mecanismo de extensão directa, de implantes de endometriose já estabelecidos, nunca foi possível demonstrar que este mecanismo seja o responsável pelo estabelecimento inicial dos referidos implantes.

2.2.3. Teoria da metaplasia celómica

Iwanoff e Meyer são os proponentes originais da teoria da metaplasia celómica (**Ridley 1968**). Segundo estes autores, o epitélio germinativo do ovário e o mesotélio do peritoneu pélvico são capazes de sofrer um processo de metaplasia endometrial. Na base desta proposta residem estudos embriológicos realizados por Gruenwald na década de 40, nos quais demonstrou uma origem comum para os canais müllerianos, o epitélio de superfície do ovário e o peritoneu pélvico (**Ridley 1968**). Os estímulos responsáveis pela transformação desses elementos epiteliais em endométrio ainda não estão clarificados. No entanto, a possibilidade de fenómenos inflamatórios, resultantes da irritação do peritoneu pélvico pela regurgitação de sangue menstrual ou de processos infecciosos agudos, poderem constituir estímulos importantes para essa metaplasia tem vindo a ser defendida (**Witz 1999**). Independentemente dos estímulos implicados na indução deste processo, a base da sustentação desta teoria reside na ocorrência de endometriose em qualquer local da cavidade abdominal, mas sobretudo relatos de situações peculiares, dificilmente explicadas por outras teorias etiopatogénicas. Exemplos dessas situações são os achados de endometriose na cavidade torácica, classicamente atribuída a um processo de metaplasia do epitélio pleural (**Foster e col. 1981; van Schil e col. 1996; Jubanyik e Comite 1997; Coimbra e col. 2000**), a ocorrência em mulheres pré-púberes (**Clark 1948**) e sobretudo a rara ocorrência em homens (**Oliker e Harris 1971; Pinkert e col. 1979; Schrodt e col. 1980**). Todavia, mesmo nestes casos de maior especificidade etiopatogénica, a inevitabilidade do envolvimento da metaplasia celómica é contestada por alguns autores (**Cassina e col. 1997**).

Segundo estes, o achado de lesões de endometriose ao nível da cavidade torácica poderá ser secundária à migração transdiafragmática de fragmentos peritoneais de endométrio ou mesmo a metástases vasculares de tecido endometrial. Por outro lado, os casos relatados em homens poderão ter resultado da presença de restos embrionários de tecido mülleriano, uma vez que em todos os casos os doentes estavam a efectuar terapêutica com estrogénios, capaz de promover a diferenciação desses restos embrionários em tecido endometrial. Esta fragilidade de sustentação da teoria da metaplasia celómica faz com que, ainda hoje, apesar de atraente, a sua aceitação na patogénese da endometriose não seja consensual.

2.2.4. Teoria da Indução

Tem sido alvo de contestação a descrição das teorias da indução e da metaplasia celómica de uma forma independente, uma vez que são consideradas complementares na explicação para o desenvolvimento das lesões de endometriose (**Witz 1999**). A proposta de uma só teoria que conjugue o fenómeno da indução com o da metaplasia celómica, eventualmente designada por teoria da indução da metaplasia celómica, poderia tornar a proposta mais facilmente compreensível sem que isso representasse qualquer desvirtuação no seu conteúdo. Apesar disso, a teoria da indução continua a ser apresentada isoladamente pela generalidade dos autores. Propõe que factores imunológicos e bioquímicos seriam responsáveis pela indução de células indiferenciadas no sentido da diferenciação em tecido endometrial. **Levander e Normann (1955)** realizaram um estudo experimental em coelhas que permitiu fundamentar esta hipótese etiopatogénica para a endometriose, ao implantarem no tecido celular subcutâneo de coelhas estimuladas com gonadotrofinas, secções da parede uterina obtidas de coelhas grávidas, com endométrio fresco ou previamente desnaturado. Sete dias depois, cortes histológicos da área implantada permitiram identificar a presença de células com características de endométrio e formações císticas, sendo a reacção tecidular mais pronunciada no caso do endométrio desnaturado, facto que levou os autores a concluir que, mais do que as células endometriais viáveis, seriam os produtos de secreção endometrial que estariam na origem do desenvolvimento da endometriose. Mais tarde, **Merril (1966)** realizou um estudo semelhante ao implantar filtros microporosos contendo miométrio, gordura ou tecido endometrial, no fundo de saco de Douglas, no retroperitoneu ou no tecido celular subcutâneo de coelhas, tendo posteriormente avaliado, através de cortes histológicos, o tecido adjacente a esses filtros. Formações císticas revestidas por células com características semelhantes às do endométrio foram observadas apenas no

tecido adjacente aos filtros contendo tecido endometrial. A presença de glândulas ou estroma endometrial, dois componentes habituais das lesões de endometriose, não foi, no entanto, passível de demonstração no tecido estudado, facto que por si só fragiliza as conclusões deste trabalho. A indução do fenómeno de metaplasia celómica no epitélio germinativo do ovário em cultura com células do estroma endometrial foi recentemente demonstrada "in vitro", após exposição a altas doses de 17β-estradiol (**Matsuura e col. 1999**). Este achado sugere que a indução da metaplasia celómica pode explicar algumas formas de endometriose, nomeadamente a endometriose ovárica.

2.2.5. Teoria dos restos embrionários

No final do século XIX, von Recklinghausen e pouco tempo depois Russel, fazem os primeiros relatos da presença, fora da cavidade uterina, de um epitélio em tudo semelhante ao endometrial, tendo ambos os autores defendido que, em presença de determinados estímulos, restos celulares de origem mülleriana poderiam sofrer uma diferenciação em tecido endometrial (**Witz 1999**; **Seli e col. 2003**). Russel baseou o seu pressuposto na constatação da presença de glândulas uterinas e tecido conjuntivo interglandular em cortes histológicos de ovários normais, originados, segundo a sua conclusão, de reminiscentes dos canais de Müller. Esta associação afigura-se, no entanto, algo simplista, uma vez que esse tecido ectópico observado no ovário poderia ser secundário a metástases vasculares ou linfáticas de tecido endometrial, de processos de metaplasia ou da simples implantação na superfície do ovário de tecido regurgitado da cavidade uterina e posteriormente invaginado (**Hughesdon 1957**; **Brosens e col. 1994**; **Witz 1999**). Mais recentemente foi possível observar em cortes histológicos seriados, a transformação gradual de tecido mülleriano em tecido endometrial em três casos de endometriose tubária e ovárica com restos embrionários adjacentes (**Mai e col. 1998**). Este fenómeno foi no entanto observado em apenas 3 das 18 doentes estudadas, motivo pelo qual os autores admitiram que se trata de um processo fisiopatológico pouco comum. A rara ocorrência de endometriose em homens (**Oliker e Harris 1971**; **Pinkert e col. 1979**; **Schrodt e col. 1980**) constitui, ainda hoje, um argumento importante para os defensores deste modelo, embora mesmo nestes casos outras possibilidades etiopatogénicas se possam admitir, como é o caso da metaplasia celómica.

2.2.6. Teoria das metástases linfáticas e vasculares

Em 1924, baseado na observação de lesões de endometriose no espaço retroperitoneal e em localizações não directamente adjacentes ao tecido peritoneal, Halban assume-se como o primeiro autor a propor esta teoria defendendo a hipótese da disseminação de tecido endometrial através do sistema linfático (**Witz 1999; Seli e col. 2003**). Um ano depois, Sampson acrescenta a possibilidade da via hematogénea para a ocorrência dessa disseminação, sustentando a sua proposta na demonstração da presença de tecido endometrial nas veias uterinas de uma doente com adenomiose (**Seli e col. 2003**). Os resultados de múltiplos estudos subsequentes vieram ao encontro destas propostas. O achado de tecido endometrial no sistema linfático em 6,5% das peças operatórias de linfadenectomia pélvica é um exemplo desse tipo de evidência (**Javert 1949**).

2.3. Formas de apresentação

Historicamente três formas diferentes de apresentação da endometriose têm sido descritas: a endometriose ovárica, a endometriose nodular profunda ou do septo rectovaginal e a endometriose peritoneal (**Brosens 1993; Donnez e col. 1996**). Apesar de alguns trabalhos importantes o terem antecedido, Sampson foi inegavelmente o autor que mais contribuiu para a descrição dessas formas de apresentação, que por envolverem mecanismos etiopatogénicos com algumas especificidades, têm sido apontadas como podendo constituir diferentes entidades clínicas e não apenas meras formas particulares de apresentação de uma mesma entidade. Em 1899 surgiram os primeiros estudos, iniciados por Russel e consolidados em 1921 por Sampson, que permitiram propor a endometriose ovárica como uma das formas de apresentação da doença (**Brosens 1993**). Contemporaneamente a estes estudos, Cullen faz em 1908 a primeira descrição da endometriose nodular profunda ou do septo rectovaginal, inicialmente designada adenomiose externa, termo que viria a ser abandonado em 1927 após novos trabalhos de Sampson. Este último autor, após ter proposto a teoria da menstruação retrógrada como base etiopatogénica da endometriose despertou o interesse científico para uma terceira forma de apresentação da doença, designada endometriose peritoneal (**Donnez e col. 1996**). A endometriose ovárica, a endometriose nodular profunda ou do septo rectovaginal e a endometriose peritoneal, apesar de apresentarem aspectos etiopatogénicos, anátomo-patológicos e clínicos

semelhantes, motivo pelo qual são ainda hoje consagradas numa única entidade clínica, apresentam especificidades suficientemente importantes que levam alguns autores a considerá-las como entidades autónomas (**Donnez e col. 1996; Nisolle 1996**).

2.3.1. Endometriose ovárica

A endometriose ovárica constitui a forma de apresentação da endometriose representada pela lesão vulgarmente conhecida por endometrioma. Foi inicialmente descrita como um cisto hemorrágico do ovário, embora com características especiais, uma vez que, ao exame microscópico, apresentava implantes superficiais de um epitélio em tudo semelhante ao endometrial (**Brosens 1993**). A análise histológica de cortes seriados de ovários contendo endometriomas no seu interior permitiu concluir que, em cerca de 90% dos casos, os endometriomas não são mais que pseudocistos extra-ováricos, cuja parede é formada pelo córtex ovárico invertido e posteriormente encerrado por processos aderenciais (Figura 2.2) (**Hughesdon 1957; Brosens e col. 1994**).

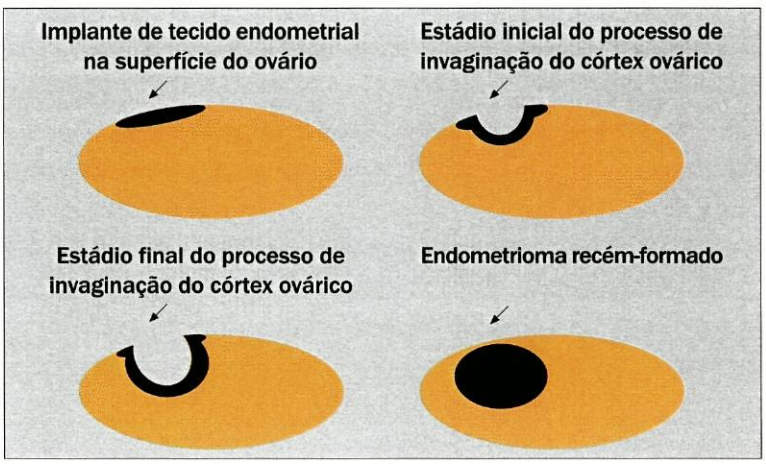


Figura 2.2: Esquema representativo do mecanismo de formação dos endometriomas (adaptado de Xavier P. Endometriose. Diferentes formas de apresentação ou mais que uma doença? Arq Med 2004;18:104).

A avaliação dos endometriomas por meio da técnica de cistoscopia ovárica, complementada por biópsias orientadas, permitiu inclusivamente identificar o ponto de retracção e invaginação inicial do córtex ovárico, geralmente representado pela presença de um implante

de tecido endometrial com glândulas e estroma na sua superfície (**Brosens e col. 1994**). Nas áreas mais periféricas do endometrioma, esse implante pode estar apenas representado por tecido glandular ou estroma, facto sugestivo de que, a partir de um ponto central de invaginação, o tecido endometrial se estende sobre a superfície do córtex ovárico, de forma a recobrir internamente a parede do endometrioma (**Brosens e col. 1994**). Esta teoria explicativa da formação do endometrioma permite compreender porque é que esta lesão não deve ser considerada como uma forma de endometriose profunda, uma vez que não há invasão do estroma ovárico.

O conteúdo do cisto, formado por restos sanguíneos resultantes de fenómenos hemorrágicos crónicos, tem uma aparência macroscópica semelhante à do chocolate, motivo pelo qual esta lesão é também conhecida por "cisto de chocolate". Esta nomenclatura aplicada aos endometriomas revela-se, no entanto, pouco precisa, uma vez que a aparência atrás descrita não é específica destas lesões, podendo também estar presente em casos de cistos do ovário com hemorragia intralesional. A localização preferencial, embora não exclusiva, dos endometriomas no ovário esquerdo é explicada por factores anatómicos facilitadores da formação de aderências entre o ovário esquerdo e as estruturas pélvicas adjacentes, nomeadamente o cólon sigmóide (**Vercellini e col. 1998; Brosens e col. 2003**).

A transformação de restos de tecido mülleriano intra-ovárico em tecido endometrial é uma hipótese igualmente admitida para a patogénese dos endometriomas. Todavia, mesmo para os seus proponentes este fenómeno foi considerado pouco comum (**Mai e col. 1998**).

A endometriose ovárica é a forma de apresentação da doença mais susceptível de ser identificada pelo recurso à ultrasonografia transvaginal (**Mais e col. 1993; Volpi e col. 1995; Dogan e col. 1996; Alcazar e col. 1997; Guerriero e col. 1998; Patel e col. 1999; Brosens e col. 2003**). Do ponto de vista da imagiologia ultrasonográfica, o endometrioma caracteriza-se fundamentalmente pela presença de ecos internos difusos e de baixa intensidade, associada a focos hiperecogénicos na parede (Figura 2.3) (**Mais e col. 1993; Volpi e col. 1995; Dogan e col. 1996; Patel e col. 1999; Brosens e col. 2003**). Estas características ultrasonográficas não são, no entanto, específicas dos endometriomas, uma vez que podem ser também identificadas em casos de cistos com hemorragia intralesional, em cistos dermóides e, ocasionalmente, em tumores epiteliais do ovário (**Aleem e col. 1995; Brosens e col. 2003**).

O recurso ao Doppler a cores parece melhorar a eficácia diagnóstica da ultrasonografia transvaginal no caso concreto dos endometriomas. No entanto, esse potencial da técnica não está totalmente clarificado. Num estudo efectuado a 27 doentes, com o objectivo de determinar a acuidade diagnóstica da ultrasonografia transvaginal, com e sem recurso à técnica de Doppler a cores, **Alcazar e col. (1997)** não encontraram diferenças com significado estatístico entre

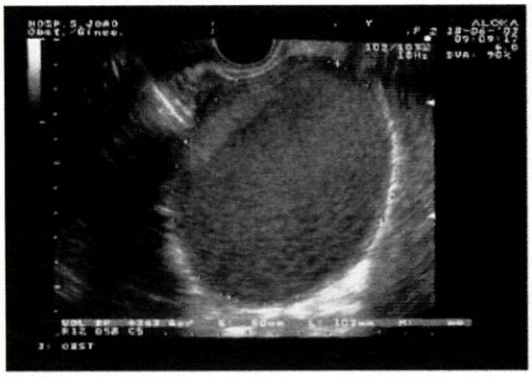


Figura 2.3: Ultrasonografia transvaginal de um endometrioma. Realce para o conteúdo do cisto caracterizado por ecos internos difusos de baixa intensidade.

essas duas modalidades. Quando o exame foi efectuado sem recurso à técnica de Doppler a cores, a sensibilidade e a especificidade encontradas (89% e 91% respectivamente), foram inclusivamente superiores às observadas para a modalidade do exame com recurso à técnica de Doppler, cuja sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 76% e 89%. **Aleem e col. (1995)** descreveram as características hemodinâmicas dos endometriomas, avaliados com recurso à tecnologia Doppler e concluíram que estas lesões císticas apresentam uma vascularização escassa, ao contrário do que acontece no caso de neoplasias do ovário ou de cistos do corpo amarelo, onde a vascularização é tipicamente densa (Figura 2.4).

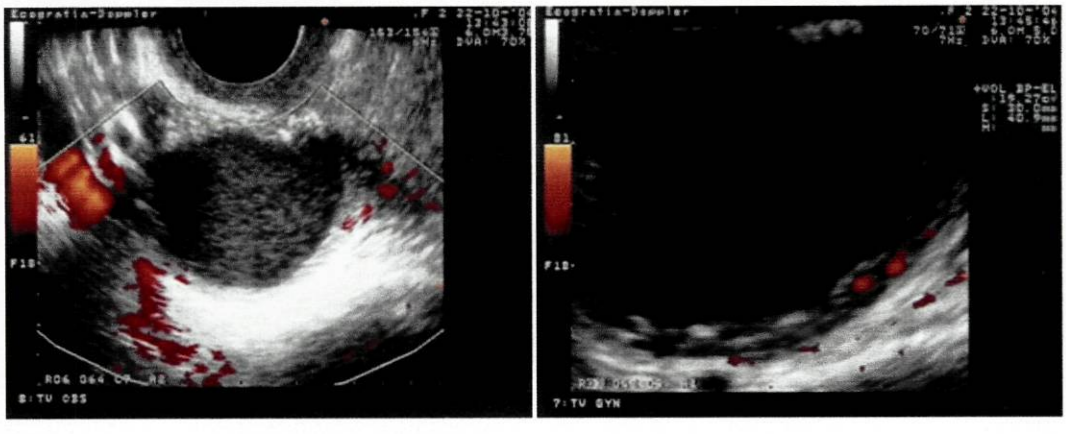


Figura 2.4: Imagens de ultrasonografia transvaginal com técnica de power Doppler. A parede do endometrioma caracteriza-se por apresentar escassos pontos de cor, traduzindo uma baixa vascularização. Na imagem da direita, para além da escassez de pontos de cor, são evidentes os focos hiperecogénicos da parede.

Com base nestas observações, concluíram que a técnica de Doppler a cores pode aumentar a eficácia diagnóstica e discriminativa da ultrasonografia transvaginal, facto que foi confirmado por **Guerriero e col. (1998)**. Num estudo realizado com 58 doentes estes autores encontraram valores de sensibilidade de 81% e especificidade de 91% quando a técnica de Doppler a cores não foi utilizada, sendo esses valores de 90 e 97% respectivamente, no caso de utilização da técnica.

Uma das maiores limitações da ultrasonografia transvaginal no diagnóstico dos endometriomas resulta da ausência de estudos adequados que permitam estabelecer uma correlação entre os achados imagiológicos e o exame histológico das amostras representativas desses achados. Este facto obriga a que o diagnóstico ultrasonográfico seja sempre confirmado pelo diagnóstico histológico.

2.3.2. Endometriose nodular profunda ou do septo rectovaginal

No início do século XX Cullen faz as primeiras referências a uma entidade clínica caracterizada pela presença de lesões nodulares constituídas por feixes de músculo liso proliferativo e de tecido conjuntivo, interpostos por aglomerados de tecido glandular e estroma endometrial (**Brosens 1993; Donnez e col. 1996**). A sua localização típica no septo rectovaginal e o seu carácter retroperitoneal, faz com que estas lesões sejam mais eficazmente detectadas através do exame pélvico ou da ressonância magnética nuclear do que pela ultrasonografia. Sob o ponto de vista semiológico estas lesões associam-se frequentemente à presença de dor pélvica crónica, dispareunia e dismenorreia e constituem a forma de apresentação da endometriose inicialmente designada por adenomiose externa e que, após os trabalhos de Sampson, se passaria a designar por endometriose nodular profunda. Esta última designação reflecte a hipótese etiopatogénica, até há poucos anos não contestada, de que as lesões profundas retroperitoneais, incluindo as do septo rectovaginal, resultam de um processo infiltrativo de lesões de endometriose, inicialmente localizadas no espaço intraperitoneal, num processo designado endometriose profunda infiltrativa (**Koninckx e Martin 1992**).

Actualmente vive-se uma era de ressurgimento do conceito da doença adenomiótica após a publicação, na segunda metade da década de 90, de importantes artigos versando este assunto (**Donnez e col. 1996; Nisolle 1996**). De acordo com **Donnez e col. (1996)**, o nódulo retroperitoneal é um nódulo adenomiótico cuja histopatogénese não depende da implantação

e posterior infiltração de células endometriais regurgitadas, mas sim da metaplasia de restos müllerianos localizados no septo rectovaginal. Esse processo metaplásico dos restos müllerianos em tecido glandular endometrial e, menos frequentemente, em estroma endometrial, é o responsável pela marcada proliferação do tecido muscular liso, criando uma aparência adenomiomatosa similar à da adenomiose da parede uterina (**Donnez e col. 1996**). Este nódulo seria então constituído por tecido muscular liso e conjuntivo, epitélio glandular activo e, quando presente, uma escassa representação de estroma endometrial, facto que levou **Nisolle (1996)** a concluir que o nódulo adenomiótico do septo rectovaginal teria uma origem diferente das lesões de endometriose peritoneal, uma vez que nestas últimas o epitélio glandular está sistematicamente envolvido por estroma do tipo endometrial. Do mesmo modo, estes autores argumentam que se a origem das duas lesões fosse comum, seria de esperar que todas as doentes com endometriose do septo rectovaginal apresentassem simultaneamente lesões intraperitoneais, o que nem sempre sucede. Finalmente, a resistência que estas lesões nodulares apresentam ao tratamento hormonal, contrariamente ao que sucede com as lesões peritoneais, é considerado mais um argumento em favor de uma origem diferente para estas duas formas de apresentação da endometriose. Por outras palavras, segundo estes autores, a endometriose ovárica e peritoneal são formas intraperitoneais da doença, ao passo que a endometriose nodular profunda ou do septo rectovaginal constitui a sua forma retroperitoneal, propondo mesmo para esta última a designação de doença adenomiótica do espaço retroperitoneal (**Nisolle e Donnez 1997**).

Esta polémica não está contudo clarificada, uma vez que a redução da profundidade e do volume do fundo de saco de Douglas nos casos de endometriose do septo rectovaginal é apontada como um argumento em favor de uma origem intraperitoneal (**Vercellini e col. 2000**). Os implantes ectópicos depositados no fundo de saco de Douglas após regurgitação tubária seriam englobados por um processo inflamatório intenso, resultando numa lesão nodular capaz de infiltrar a parede muscular do recto e da vagina, sustentando as observações de **Koninckx e Martin (1992)** sobre a existência de uma forma de endometriose profunda infiltrativa (**Vercellini e col. 2004**). Para estes autores a endometriose é então uma entidade única com diferentes formas de apresentação que se podem caracterizar por mecanismos de desenvolvimento distintos.

2.3.3. Endometriose peritoneal

Os trabalhos de Sampson e a proposta da teoria da menstruação retrógrada como base

etiopatogénica da endometriose constituem os fundamentos da proposta da endometriose peritoneal como uma forma adicional de apresentação da doença (**Brosens 1993**). As lesões que a caracterizam podem designar-se por lesões típicas ou atípicas em função do seu aspecto macroscópico. A observação das chamadas lesões peritoneais típicas, acastanhadas ou violáceas, também conhecidas por lesões em "olho-de-perdiz", permite a suspeição do diagnóstico de endometriose no decurso de uma cirurgia laparoscópica. No entanto, esta entidade é também caracterizada pela presença de lesões vermelhas ou brancas, designadas por lesões atípicas ou subtis. Segundo vários autores, a aparência macroscópica das lesões reflecte as diferentes fases da evolução que se seguem ao fenómeno inicial de implantação do tecido endometrial ectópico no mesotélio peritoneal (Figura 2.5) (**Jansen e Russel 1986; Brosens 1994; Nisolle e Donnez 1997; Donnez e col. 2002**).

De acordo com **Donnez e col. (2003)**, o tecido endometrial ectópico viável começa por se implantar na superfície do mesotélio peritoneal, induzindo a formação de numerosos vasos sanguíneos e linfáticos subperitoneais. Este fenómeno de angiogénese, para além de ser decisivo para o desenvolvimento das lesões, confere-lhes uma coloração avermelhada. Por este facto, as lesões vermelhas são consideradas as mais activas e mais vascularizadas e classificadas como lesões iniciais (**Donnez e col. 2003**). Estas, para além de apresentarem uma vasta rede de vasos sanguíneos e linfáticos, são histologicamente caracterizadas pela presença de células e estroma endometrial que sofrem ciclicamente um processo de descamação e extravasamento sanguíneo em tudo semelhante ao mecanismo da menstruação. A reacção inflamatória induzida por este fenómeno cíclico condiciona o aparecimento de uma escarificação do tecido sublesional que acaba por encarcerar o implante. Ficam assim criadas as condições para que ocorra a acumulação de restos tecidulares intraluminais, facto que caracteriza as lesões típicas, de cor castanha ou violácea (**Donnez e col. 2003**). Esta reacção inflamatória e a subsequente fibrose são as responsáveis pela marcada redução da vascularização que se verifica na fase final de evolução das lesões. Em determinadas situações, a redução da vascularização é mesmo completa, originando as lesões brancas, não pigmentadas, que se caracterizam, sob o ponto de vista histológico, pela presença de placas esbranquiçadas de colagénio (**Nisolle 1996; Donnez e col. 2003**). As lesões brancas são inactivas, podem representar formas cicatriciais ou latentes de endometriose, sendo habitualmente conotadas com o estádio final de evolução das lesões (**Brosens 1994; Nisolle e Donnez 1997; Donnez e col. 2003**).

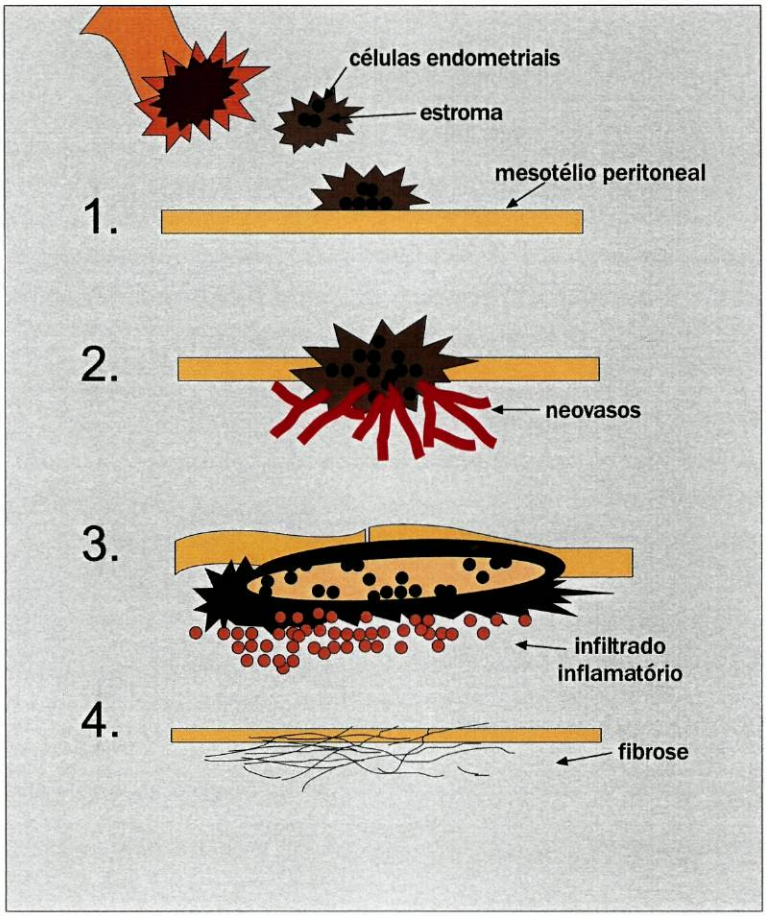


Figura 2.5: Diferentes fases de evolução das lesões de endometriose peritoneal. 1: Disseminação de tecido endometrial a partir da trompa uterina e posterior adesão ao mesotélio peritoneal. 2. Lesões vermelhas: após a adesão do tecido endometrial ao mesotélio peritoneal, segue-se a fase de invasão, com proeminência para os fenómenos de angiogénese. 3: Lesões castanhas: o extravasamento sanguíneo a partir das lesões confere a típica coloração acastanhada onde é notório o abundante infiltrado inflamatório. 4: Lesões brancas: a última etapa deste processo evolutivo é dominada pela formação de fibrose (adaptado de Xavier P. Endometriose. Diferentes formas de apresentação ou mais que uma doença? Arq Med 2004; 18:106).

2.4. A fisiopatologia da endometriose à luz dos conhecimentos actuais no campo da biologia molecular

A proliferação de teorias que têm sido propostas com o objectivo de explicar a etiopatogénese da endometriose é um facto marcante e que incontornavelmente se associa a esta entidade. A grande questão que está na base do debate científico da actualidade resulta, no entanto, do facto de nenhuma delas ser capaz de justificar por si só as diferentes formas de manifestação da doença (**Harada e col. 2001**). A teoria da menstruação retrógrada é a que mais claramente satisfaz a comunidade clínica que lida com esta entidade, uma vez que é facilmente entendida por ela própria e sobretudo pelas pacientes ávidas de respostas (**Redwine 2002, Seli e col. 2003**). A teoria da indução / metaplasia celómica é igualmente atraente, uma vez que, como atrás ficou patente, permite explicar formas de apresentação da doença dificilmente compreensíveis com base apenas no fenómeno da implantação de fragmentos endometriais resultantes da menstruação retrógrada. Numa era em que a compreensão dos fenómenos biomoleculares domina a atenção dos investigadores em todas as áreas da medicina, estas teorias, apesar de atraentes pela sua simplicidade explicativa, apresentam no entanto, um carácter mecanicista demasiadamente frágil para poderem ser aceites pacificamente pela comunidade científica. A endometriose, não só não escapa a esta onda de entusiasmo generalizado pelo estudo dos fenómenos biomoleculares como parece constituir em si mesmo um modelo ímpar para esse estudo, tal a sua complexidade.

As investigações mais recentemente realizadas na área da fisiopatologia da endometriose têm resistido à tentação de abandonar definitivamente o mecanicismo dos modelos inicialmente descritos. Pelo contrário, observa-se um esforço contínuo de a eles adaptarem os mais recentes conhecimentos da biologia molecular. Se admitirmos que a teoria da menstruação retrógrada mantém uma pertinência inquestionável, apesar das várias décadas de debate que entretanto atravessou, múltiplos eventos terão que ser admitidos para que um processo, essencialmente fisiológico, resulte no estabelecimento de lesões endometrióticas (**Seli e col. 2003**). Desde logo é vital que ocorra a adesão e posteriormente a invasão das células endometriais no mesotélio peritoneal, ou seja, que ocorra uma implantação celular na sua plenitude (**Harada e col. 2001; Seli e col. 2003**). Na opinião de **Seli e col. (2003)**, a sobrevivência e proliferação das células endometriais ectópicas será obrigatoriamente o passo que se segue à implantação para que desta possa resultar o estabelecimento de doença. Em todo este processo, os factores ambientais,

genéticos, imunológicos e endócrinos, desempenham um papel de suporte e facilitação desde há muito tempo reconhecido (Figura 2.6) (**Simpson e col. 1980; Moen e Magnus 1993; Kennedy e col. 1995; dos Reis e col. 1999; Harada e col. 2001; Seli e col. 2003**).

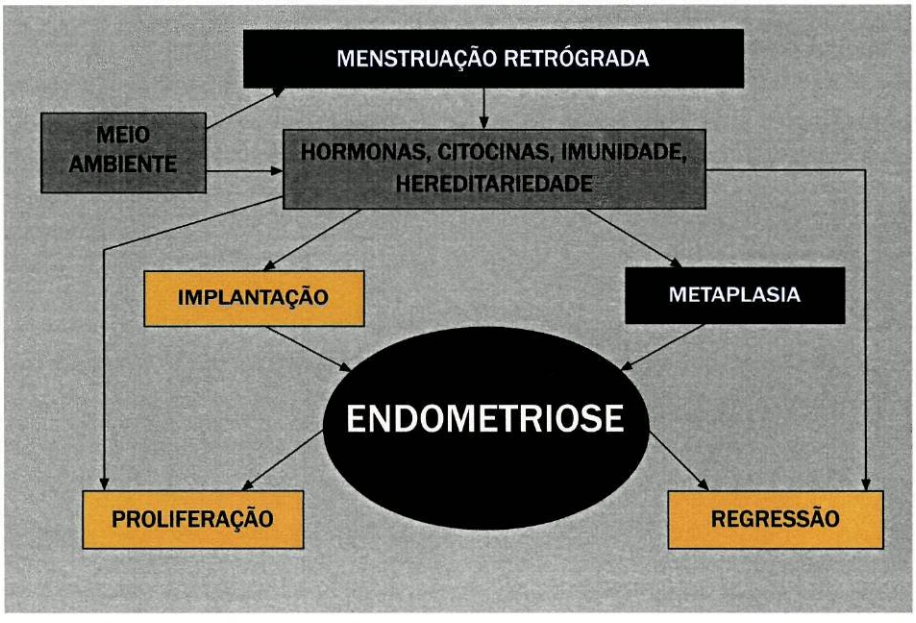


Figura 2.6: Diagrama representativo de um possível modelo para a etiopatogénese da endometriose (adaptado de Harada et al. Role of cytokines in endometriosis. Fertil Steril 2001; 76:3).

2.4.1. Implantação das células endometriais no mesotélio peritoneal

a. Os mecanismos envolvidos no processo de adesão celular

A capacidade intrínseca das células endometriais intraperitoneais de algumas mulheres de aderirem e invadirem o mesotélio, ou seja, de nele se implantarem, poderá explicar as nítidas diferenças entre a prevalência do fenómeno da menstruação retrógrada e o da endometriose (**Witz 1999; Harada e col. 2001; Seli e col. 2003**). A interacção entre o endométrio regurgitado e o mesotélio peritoneal, apesar de controversa, constitui, segundo alguns autores, o fenómeno

chave para a ocorrência da implantação (**Spuijbroek e col. 1992; Martelli e col. 1993; Jeziorska e col. 1996; Osteen e col. 1996; van der Linden e col. 1996; Bruner e col. 1997; Kokorine e col. 1997; Witz e col. 1999**). **Spuijbroek e col. (1992)** demonstraram que as lesões precoces de endometriose têm a capacidade de invadir a matriz extracelular do peritoneu, facto suportado pelos achados de **Kokorine e col. (1997)**, segundo os quais, as lesões activas de endometriose caracterizam-se por um aumento da expressão da colagenase intersticial. A observação "in vitro", de que células endometriais são capazes de aderir a fragmentos de membranas amnióticas, muito semelhantes ao peritoneu no que diz respeito à expressão de citoqueratinas epiteliais e da matriz extracelular, veio legitimar ainda mais este modelo de interacção celular como base fisiopatológica para o estabelecimento inicial das lesões de endometriose (**van der Linden e col. 1996**). A observação feita por estes autores de que a camada epitelial de amniócitos, desde que intacta, previne a adesão das células endometriais, levou-os a concluir que a ocorrência da implantação implicava a existência de soluções de continuidade pós-traumática no epitélio mesotelial. Achados semelhantes foram referidos em estudos subsequentes (**Groothuis e col. 1999; Koks e col. 1999**). **Witz e col. (1999)**, pelo contrário, concluíram que o mesotélio não funciona como barreira à adesão do endométrio. Após terem cultivado fragmentos endometriais com extractos de peritoneu da parede abdominal e do fundo de saco de Douglas, observaram que as células do estroma endometrial aderiam ao mesotélio, mesmo que este se apresentasse intacto. Notaram igualmente que, nos locais de implantação, era sistemática a presença de quebras da barreira mesotelial, sendo que esse fenómeno era secundário à implantação dos fragmentos de endométrio e não uma condição para que esta ocorresse. Estes achados levaram os autores a concluir que as células do estroma endometrial, para além de aderirem ao mesotélio, são as responsáveis pela invasão da sua matriz extracelular, reconhecendo, no entanto, que mais estudos são necessários para caracterizar correctamente estes mecanismos celulares. Em estudos subsequentes **Witz e col. (2001)** confirmaram os resultados iniciais, nomeadamente os que lhe permitiram concluir que nesse processo de adesão estão envolvidas as células do estroma endometrial e não apenas as células epiteliais.

Para compreender este processo, aparentemente complexo, da implantação do endométrio ectópico no mesotélio peritoneal, será necessário clarificar os mecanismos biomoleculares nele envolvidos (**Harada e col. 2001**).

As moléculas de adesão celular têm assumido um protagonismo considerável nesta postura de investigação dos fenómenos biomoleculares aplicados à etiopatogénese da endometriose. Várias dessas moléculas foram já descritas, com destaque para o grupo das integrinas, caderinas, família CD44, selectinas e a superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 e CD31) (**Holness e Simmons 1994; Rosen e Bertozzi 1994; Haas e**

Plow 1994; Behrens 1995; Stauder e Günthert 1995). Estão já publicados trabalhos que implicam o envolvimento das moléculas CD44 e ICAM-1 na fisiopatologia da endometriose (**Somigliana e col. 1996; Fukaya e col. 1999; Dechaud e col. 2001; Calhaz-Jorge e col. 2003a**); no entanto, parecem ser as integrinas e as caderinas as de maior importância na manutenção da adesividade entre as células e entre estas e a matriz extracelular (**van der Linden e col 1995**). As integrinas são glicoproteínas transmembrana heterodiméricas compostas por uma subunidade α e uma β que funcionam como receptores de superfície não apenas para mediação da adesão das células entre si, mas sobretudo da adesão entre as células e a matriz extracelular (**Hynes 1992**). A sua expressão por células neoplásicas do ovário foi já implicada no mecanismo de adesão dessas mesmas células ao mesotélio peritoneal (**Strobel e Cannistra 1999; Lessan e col. 1999**). Essa convicção encontrou um suporte importante nos achados de **Witz e col. (2000)**, que identificaram as integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ na superfície das células mesoteliais, apontando-as como potenciais mediadoras da adesão de células neoplásicas e endometriais que ocorre a esse nível.

Tanto ou mais importantes que as integrinas na mediação da adesão intercelular parecem ser as caderinas, grupo de glicoproteínas transmembrana dependentes do cálcio, cuja principal função é a da manutenção da arquitectura tecidular (**Takeichi 1991; van der Linden 1996; Truong e Ikura 2002**). Dos diferentes tipos de caderinas existentes destacam-se a caderina-N ou caderina neuronal, forma predominante nos tecidos neuronais, a caderina-P ou caderina placentária, cuja expressão está limitada à epiderme, mesotélio e epitélio da córnea e a caderina-E ou caderina epitelial, cuja expressão se limita aos tecidos epiteliais não neuronais (**Shimoyama e col. 1989; Takeichi 1991**). A caderina-E tem merecido, desde há vários anos, uma atenção muito particular por parte de investigadores ligados à área da oncologia (**Shimoyama e col. 1989; Katayama e col. 1994; Koch e Franke 1994; Ranscht 1994; Behrens 1995; Carneiro e col. 1999; Machado e col. 2000 e 2001; Sundfeldt e col. 2001; Huntsman e col. 2001; Sobrinho-Simões e Oliveira 2002; Juhasz e col. 2003**). **Behrens (1995)** sugeriu que a caderina-E teria uma acção supressora das metástases e que a sua perda pelos tecidos epiteliais poderia associar-se ao comportamento invasivo das células tumorais. Por outro lado, a presença de mutações no gene que codifica a caderina-E tem sido associada a um aumento de risco de cancro do estômago (**Carneiro e col. 1999; Machado e col. 2000 e 2001; Huntsman e col. 2001; Sobrinho-Simões e col. 2002**). A determinação dos níveis séricos da caderina-E também tem sido alvo de estudo em doentes oncológicos. **Katayama e col. (1994)** foram os primeiros autores a estudar os níveis séricos da caderina-E em doentes com patologia neoplásica. Determinaram, através de um ensaio imunoenzimático (ELISA), os níveis séricos desta molécula em doentes

com cancro do estômago e do fígado, tendo constatado um aumento significativo da sua imunoreactividade quando comparada com indivíduos saudáveis. Os mesmos resultados foram obtidos por outros autores em doentes com cancro do estômago, da bexiga, melanoma maligno cutâneo, doença de Paget invasiva e cancro do ovário em estádios III ou IV (**Griffiths e col. 1996; Shirahama e col. 1996; Gofuku e col. 1998; Gadducci e col. 1999; Chan e col. 2003; Juhasz e col. 2003**). Nas conclusões destes estudos a caderina-E é sistematicamente apontada como um potencial marcador tumoral prospectivo. Por outro lado, **Shirahama e col. (1996)** observaram um aumento dos níveis séricos desta molécula no soro de doentes com formas graves de psoríase e de dermatite atópica, facto que lhes permitiu apontar a sua potencial utilização como marcador sérico de formas graves de doenças inflamatórias cutâneas, para além do já referido interesse como marcador tumoral.

A importância destas moléculas para a mediação da adesão das células entre si e à matriz extracelular despertou também o interesse dos investigadores para a sua aplicação ao estudo do endométrio e da endometriose. **van der Linden e col. (1994)** determinaram por métodos imunohistoquímicos a expressão da caderina-E e das integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$, em células obtidas na fase folicular precoce do ciclo menstrual, a partir do líquido peritoneal, do endométrio ectópico, do fluxo menstrual, do peritoneu e de endometriomas. Constataram que a caderina-E e todas as integrinas, com excepção da integrina $\alpha 6\beta 1$, eram expressas não apenas nos endometriomas, mas também nas restantes células ou tecidos potencialmente envolvidos na etiopatogénese da endometriose. Levantaram pela primeira vez a hipótese do envolvimento destas moléculas no processo de menstruação retrógrada e da adesão dos fragmentos endometriais ao mesotélio peritoneal. Um ano depois, o mesmo grupo levou a cabo um estudo onde pretendeu avaliar, novamente por métodos imunohistoquímicos, a expressão da caderina epitelial e placentária e das integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$, no endométrio humano ao longo do ciclo menstrual (**van der Linden e col. 1995**). Nesse trabalho verificaram que o endométrio expressa, sem variações entre as diferentes fases do ciclo menstrual, todas as moléculas de adesão estudadas, com excepção da integrina $\alpha 2\beta 1$, que se encontrava ausente na fase secretora intermédia. A partir deste trabalho, os autores reforçam a hipótese já anteriormente equacionada do provável envolvimento destas moléculas no processo de adesão dos fragmentos endometriais ao mesotélio peritoneal ao demonstrar que o endométrio humano expressa, sem excepção, todas as moléculas de adesão estudadas na fase secretora tardia, ou seja, na fase do ciclo em que ocorre o fluxo retrógrado para a cavidade peritoneal. Terminam, no entanto, com o reconhecimento de que a potencial função na patogénese da endometriose continua por esclarecer. Em 1997 **Gaetje e col. (1997)** publicaram

um trabalho baseado na premissa de que a caderina-E, ao funcionar nos carcinomas como molécula supressora das metástases, poderia estar envolvida na modulação da capacidade invasora das células endometriais em doentes com endometriose. Os resultados desse estudo foram ao encontro da hipótese inicialmente colocada, uma vez que revelaram que o endométrio ectópico apresentava um número significativamente maior de células epiteliais negativas para a caderina-E (logo com maior capacidade de invasão) quando comparadas com o endométrio eutópico. Estes resultados foram posteriormente confirmados por diferentes autores (**Darai e col. 1998; Scotti e col. 2000; Poncelet e col. 2002**). Com base nestas observações é lícito admitir que as moléculas de adesão, particularmente a caderina-E, possam desempenhar um papel importante na etiopatogénese da endometriose, nomeadamente na fase inicial do estabelecimento das lesões peritoneais, funcionando como mediadoras da interacção das células epiteliais entre si e com o mesotélio peritoneal. A utilidade potencial da caderina-E como eventual marcador sérico da endometriose não foi, no entanto, alvo de qualquer estudo, facto que determinou a sua inclusão no trabalho de investigação que serve de base a esta dissertação.

b. Os mecanismos envolvidos no processo de invasão celular

Ultrapassada a fase inicial de adesão celular, a invasão do mesotélio peritoneal pelas células endometriais é um fenómeno considerado crucial para que ocorra o desenvolvimento das lesões de endometriose. Este processo de invasão parece ser altamente dependente da acção de enzimas proteolíticas designadas metaloproteases da matriz (MMPs) e dos seus inibidores, os inibidores tecidulares das metaloproteases da matriz (TIMPs) (**Seli e col. 2003**). As MMPs são responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular, tal como o colagénio, os proteoglicanos, a fibronectina e a laminina (**Koks e col. 2000**). Do balanço entre estas enzimas e os seus inibidores, resulta a remodelação cíclica e fisiológica de vários tecidos em processos fisiológicos, nomeadamente na embriogénese, na reparação tecidular, na invasão trofoblástica extravilositária e na menstruação (**Salamonsen e Woolley 1996; Hulboy e col. 1997; Koks e col. 2000**). Da sua acção podem também resultar processos patológicos como a artrite reumatóide e a invasão tumoral (**Stetler-Stevenson e col. 1993**). Para além de já ter sido identificada a expressão das MMPs ao nível do endométrio, foi também demonstrado que ela é máxima durante a menstruação, fenómeno que parece estar dependente da queda dos níveis de progesterona (**Salamonsen e Woolley 1996; Kokorine e col. 1996; Jeziorska e col. 1996; Koks e col. 2000**). Este achado vem de encontro à hipótese já aventada, segundo a qual as MMPs estão directamente envolvidas no fenómeno de invasão do mesotélio peritoneal pelas

células endometriais, ou seja no processo de implantação celular que determina o desenvolvimento das lesões de endometriose (**Spuijbroek e col. 1992; Bruner e col. 1997; Koks e col. 2000**). A demonstração, em doentes com endometriose, da existência de uma desregulação na expressão das MMPs e das TIMPs no líquido peritoneal e nos endometriomas, é igualmente um dado a favor do seu envolvimento na patogénese da doença. **Bruner e col. (1997)** foram capazes de demonstrar esse envolvimento através de estudos realizados no modelo animal, nos quais começaram por efectuar o tratamento de tecido endometrial humano com progesterona, de forma a inibir a actividade das MMPs. Posteriormente transplantaram para o modelo animal esse tecido previamente tratado e observaram que não havia lugar ao desenvolvimento de lesões de endometriose, contrariamente ao que acontecia nos animais transplantados com tecido endometrial não tratado, nos quais ocorria a formação das referidas lesões. Nestes últimos, a injecção intraperitoneal de TIMPs (outra forma de inibir a actividade das MMPs) permitia evitar o desenvolvimento da doença. Concluíram então que a actividade excessiva das MMPs no tecido endometrial ectópico, ou na sua vizinhança, poderia facilitar a invasão e crescimento das lesões de endometriose. Igualmente importante para a compreensão da patogénese da endometriose, nomeadamente dos seus circuitos parácrinos, foi a observação de que a acção inibitória da progesterona sobre as MMPs parece ser mediada por determinadas citocinas, tal como o TGF-β e a IL1 (**Bruner e col. 1999; Osteen e col. 1999**). Todas estas considerações parecem sugerir que o tecido endometrial ao entrar na cavidade abdominal e após aderir ao mesotélio peritoneal promove a síntese de MMPs e, desse modo, a invasão da matriz extracelular desse mesmo mesotélio (**Koks e col. 2000**). Igualmente implícita a estes achados está a presunção de que a quantidade de tecido endometrial que tem acesso à cavidade abdominal, directamente proporcional ao volume de menstruação retrógrada, determina em grande parte o maior ou menor grau de risco para o desenvolvimento de endometriose.

2.4.2. Sobrevivência e proliferação das células endometriais ectópicas

a. Angiogénese

A importância da angiogénese, definida em termos genéricos como a formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente é, desde há muito, reconhecida na fisiologia dos tecidos humanos (**Guyton 1986**). A identificação da ocorrência desse processo na placenta motivou a utilização deste termo pela primeira vez em 1935 (**Reynolds e Bicknell**

1995). A formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes é secundária à acção de um estímulo adequado. Na sua presença ocorre a proteólise da membrana basal e a degradação da matriz intersticial dos capilares adjacentes, facto que permite a migração de pequenos grupos de células endoteliais em direcção ao estímulo angiogénico, local onde essas células vão proliferar de forma a constituir uma nova ansa capilar (**Guyton 1986**). São actualmente conhecidos numerosos factores com potencial para a modulação da angiogénese, embora, na maior parte dos casos, com mecanismos de actuação ainda não totalmente esclarecidos. Por ser o melhor estudado e provavelmente o mais potente, destaca-se entre estes o VEGF (**Phillips e col. 1990; Shweiki e col. 1993; Redmer e Reynolds 1996; Yamamoto e col. 1997; Yan e col. 1998; Reynolds e Redmer 1998; Ferrara e col. 1998; Kumar-Singh e col. 1999; Orre e Rogers 1999; McLaren 2000; Xavier 2000**). O TNF-α, a IL8, o FGF-1 e -2 e o TGF, apresentam igualmente uma reconhecida importância (**Redmer e Reynolds 1996; Ryuto e col. 1996; Reynolds e Redmer 1998; Kumar-Singh e col. 1999; Fasciani e col. 2000; Xavier 2000; Calhaz-Jorge e col. 2003b**). Muitos outros factores estão a ser estudados, tendo já sido demonstrada a sua participação de forma directa ou indirecta no fenómeno da angiogénese. Exemplos são a angiogenina, a eritropoietina, a angiotensina II, o ANP, o VIP e o PAF, entre outros (**Andrade e col. 1994; Hu e col. 1996; Pedram e col. 1997; Lee e col. 1999; Ribatti e col. 1999**). A angiogénese é o resultado de uma complexa interacção de factores estimuladores e inibidores, onde também parecem participar os fenómenos inflamatórios que reconhecidamente podem ter uma acção mitogénica, nomeadamente sobre as células endoteliais.

A investigação do fenómeno da angiogénese constitui actualmente uma das áreas da medicina que mais empenho tem merecido por parte da comunidade científica, uma vez que um crescimento inapropriado destas ansas capilares tem sido associado a vários processos patológicos, nomeadamente à sustentação do desenvolvimento de tumores, retinopatias proliferativas, hemangiomas e fibroses no caso de um crescimento excessivo, ou a anomalias nos processos de cicatrização em casos de crescimento deficiente (**Augustin e col. 1995; Redmer e Reynolds 1996**). O significado deste processo, quando enquadrado no domínio da oncologia, assume uma importância acrescida, uma vez que é actualmente reconhecido que a densidade da vascularização intratumoral representa um indicador para a emergência e crescimento de lesões malignas e, no caso de tumores sólidos, constitui mesmo um factor de prognóstico independente (**Obermair e col. 1999**).

Os órgãos reprodutores femininos constituem um alvo preferencial de investigação da angiogénese, uma vez que o endométrio, os folículos ováricos e o corpo amarelo são, juntamente

com a placenta, locais do organismo da mulher saudável onde este fenómeno ocorre repetidamente e com um significado suficientemente importante para constituir um modelo de estudo fisiológico (**Reynolds e Bicknell 1995; Augustin e col. 1995; Modlich e col. 1996**). No caso concreto destes órgãos, os desvios no fenómeno da angiogénese podem levar ao aparecimento de entidades clínicas tão variadas como a síndroma do ovário policístico, a síndroma de hiperestimulação ovárica, as hemorragias uterinas disfuncionais, a adenomiose, os leiomiomas uterinos, a hiperplasia e o carcinoma do endométrio, o carcinoma do ovário e a endometriose (**Xavier 2000; Reynolds e col. 2002; Xavier e col. 2004a; Xavier e col. 2004b**). A implantação das células endometriais ectópicas no mesotélio peritoneal ou na superfície do ovário corresponde à etapa inicial da formação de uma nova lesão de endometriose. O seu desenvolvimento e impacto clínico subsequente é, no entanto, fortemente dependente da formação de uma rede vascular sublesional capaz de garantir o aporte sanguíneo necessário à proliferação e sobrevivência celular (Figuras 2.7 e 2.8).

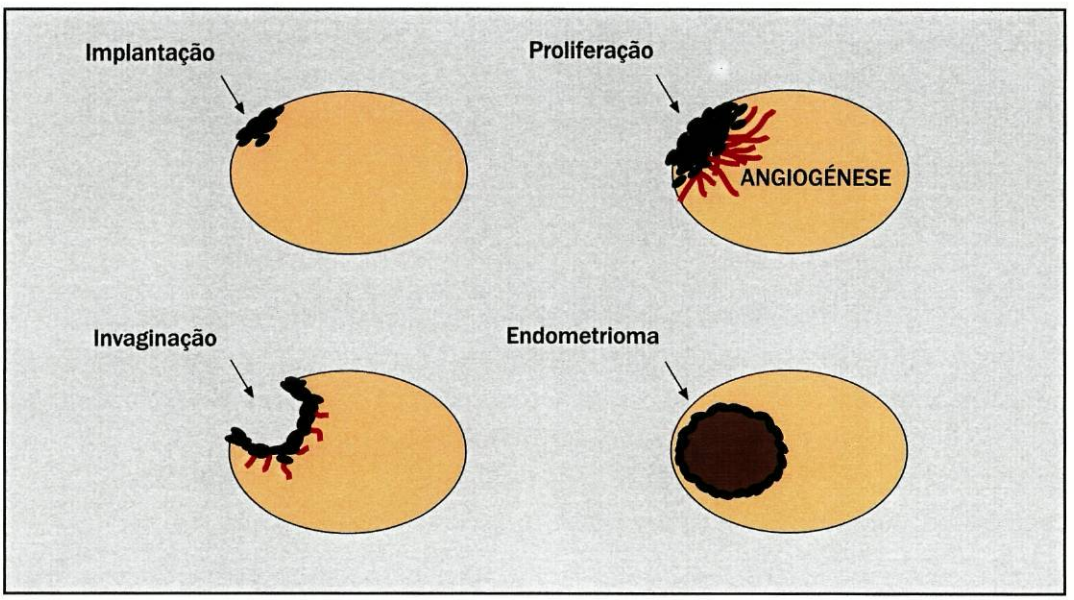


Figura 2.7: As primeiras etapas da formação dos endometriomas são marcadas por intensos fenómenos de angiogénese, fundamentais para o posterior desenvolvimento das lesões.

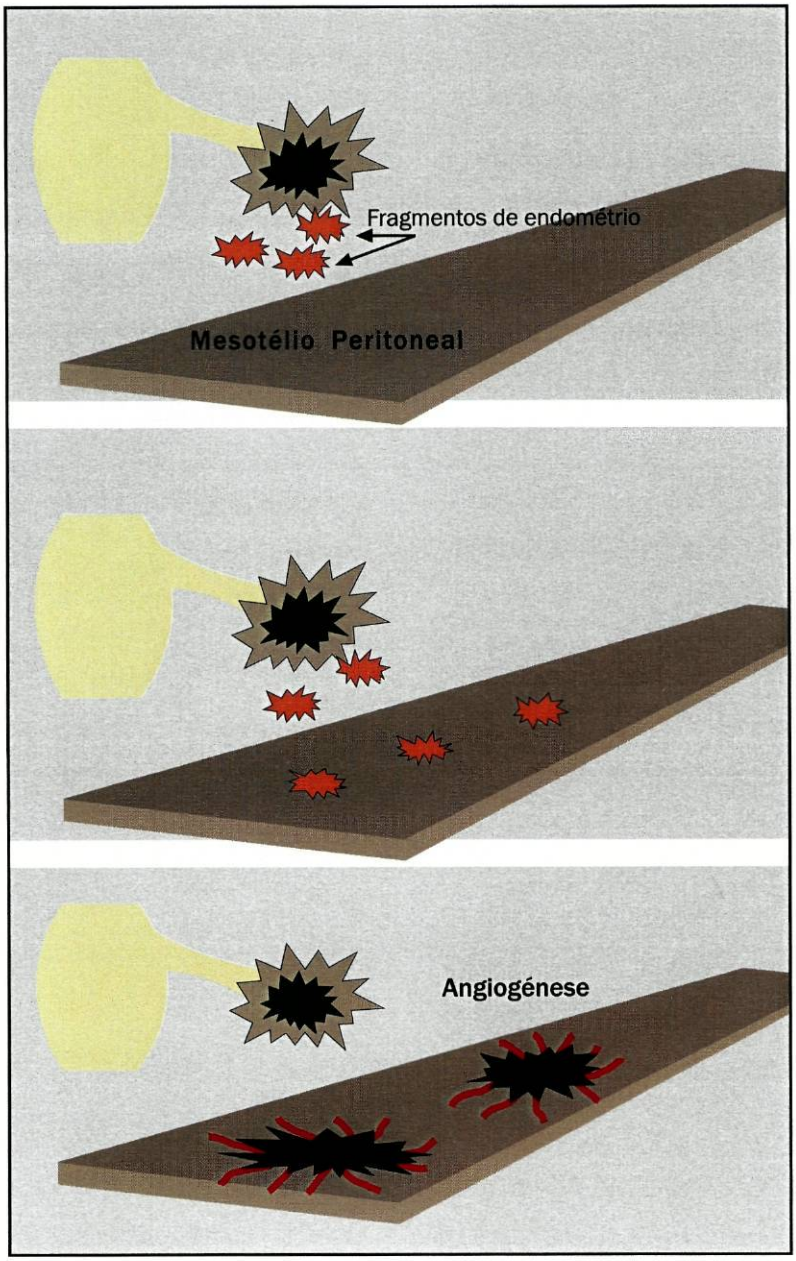


Figura 2.8: A angiogénese que ocorre após o processo de implantação dos fragmentos de endométrio permite a formação de uma rede vascular sublesional, sem a qual não ocorrerá o desenvolvimento das lesões de endometriose no mesotélio peritoneal.

É actualmente reconhecido que o crescimento tecidular acima de uma dimensão correspondente a cerca de 1 x10^6 células requer a formação de novos vasos sanguíneos, facto que permite compreender a importância da angiogénese em todo este processo (**Witz 1999**). A produção de factores angiogénicos, nomeadamente do VEGF, pelas lesões de endometriose, constitui um dos possíveis mecanismos através do qual os implantes, na sua fase inicial de desenvolvimento, asseguram essa neovascularização (**Donnez e col. 1998; Witz 1999; McLaren 2000; Fasciani e col. 2000**).

Fasciani e col. (2000) compararam os níveis intralesionais do VEGF e da IL8, determinados através de um ensaio imunoenzimático (ELISA), em endometriomas e em cistos foliculares e concluíram que os níveis destes factores angiogénicos são significativamente mais elevados nos endometriomas. Por outro lado, **Donnez e col. (1998)** observaram que em doentes com endometriose, a expressão imuno-histoquímica do VEGF era maior no endométrio ectópico que no eutópico, facto que interpretaram como sendo resultante da forte actividade angiogénica das lesões de endometriose. No mesmo estudo, em concordância com a hipótese etiopatogénica de que as lesões vermelhas são mais precoces e mais activas que as lesões castanhas, estes autores verificaram que a maior expressão do VEGF se observava nas lesões vermelhas, ao passo que as lesões castanhas apresentavam uma pobre expressão desse factor, resultante da sua já escassa vascularização. Mas o aumento da actividade angiogénica que ocorre em doentes com endometriose não parece ser da exclusiva responsabilidade do endométrio ectópico, já que uma maior expressão imuno-histoquímica do VEGF no endométrio eutópico de doentes com endometriose relativamente a mulheres sãs foi igualmente observada por **Donnez e col. (1998)**. Estes achados apoiam a hipótese da disfunção endometrial como factor contributivo para o desenvolvimento inicial da endometriose, uma vez que o endométrio dessas doentes seria caracterizado por ter um maior potencial angiogénico e, dessa forma, uma maior capacidade para se implantar e proliferar fora da cavidade uterina (**Donnez e col. 1998; Healy e col. 1998; Fasciani e col. 2000; Xavier e col. 2004a e 2004b**).

Para além do tecido endometrial eutópico e ectópico, os macrófagos peritoneais parecem ser igualmente locais de forte produção do VEGF. Um aumento da concentração deste factor no líquido peritoneal de doentes com endometriose, quando comparada com mulheres sãs, foi já relatado por diversas vezes, facto que sustenta o importante papel que a actividade deste factor parece exercer no estabelecimento e manutenção inicial das lesões (**Oosterlynck e col. 1993a; McLaren e col. 1996; Shifren e col. 1996; Kupker e col. 1998; Mahnke e col. 2000; Wu e Ho 2003**). Por outro lado, a evidência de altas concentrações de VEGF nos endometriomas sugere que a angiogénese possa ser um evento específico para o desenvolvimento dessas

lesões císticas (**Fasciani e col. 2000**).

Apesar de atraente seria demasiadamente simplista pensar que as citocinas actuam apenas num determinado mecanismo biomolecular envolvido na fisiopatologia da endometriose. A evidência de que a actividade desses factores é geralmente mais complexa está na demonstração das propriedades biológicas do TNF-α. Trata-se de uma citocina que promove a angiogénese mediante a mobilização de células do sistema imunitário, sobretudo dos macrófagos, e a libertação de outras citocinas e factores de crescimento, merecendo por isso uma atenção particular no contexto da etiopatogénse da endometriose (**Iwabe e col. 2000; Gazvani e Templeton 2002**). No entanto, para além da sua acção angiogénica, foi já demonstrado que o TNF-α também é capaz de estimular a adesão das células endometriais ao colagénio, promover a sua proliferação e aumentar a expressão das MMPs, facilitando desse modo o processo de invasão celular (**Iwabe e col. 2000; Gazvani e Templeton 2002**). Parece então que esta citocina actua em diferentes fases do desenvolvimento das lesões de endometriose. Sendo um produto de secreção dos macrófagos, a demonstração do aumento dos seus níveis no liquido peritoneal em doentes com endometriose aponta claramente para uma participação deste factor na fisiopatologia da doença (**Vignali e col. 2002; Bullimore 2003**).

b. Apoptose.

Se os mecanismos de angiogénese são importantes para a regeneração cíclica do endométrio, não menos importantes parecem ser os fenómenos de apoptose que antecedem a descamação menstrual. A importância da apoptose, também designada de morte celular programada, para homeostasia dos tecidos orgânicos já há muito foi reconhecida. Em 1885 surgem, por intermédio de Flemming, os primeiros relatos sobre a presença de duas formas diferentes de morte celular: o "suicídio celular" ao qual Kerr em 1972 atribui o termo apoptose e o "homicídio celular" ou necrose (**Kerr e col. 1972; Kane 1995**). **Manjo e Joris (1995)** propõem um novo conceito para os termos apoptose, oncose e necrose. Segundo estes autores, a apoptose e a oncose representariam os eventos iniciais do mecanismo de morte celular, por suicídio ou homicídio, sendo a necrose o estádio final comum a ambos. Esta teoria não recebeu grande aceitação por parte da comunidade científica que continua a considerar apenas a existência da apoptose como contraposição à necrose, sem contemplar a existência da oncose (**Xavier 2002**). Por este facto, optou-se também neste trabalho por seguir as recomendações da generalidade dos autores ao admitir apenas os conceitos de apoptose e necrose.

A apoptose pode ser distinguida da necrose por critérios morfológicos e bioquímicos bem definidos. Uma diferença importante entre ambas reside no facto da apoptose ter uma maior apetência para a delecção celular selectiva, ao passo que a necrose afecta grupos celulares indiscriminadamente. Do ponto de vista morfológico esta última é caracterizada pelo aparecimento de intumescência citoplasmática, vacuolização dos organelos e vesiculação da membrana citoplasmática. É tipicamente acompanhada de lise nuclear (cariólise), ocorrendo fragmentação do ADN com um padrão não específico (**Manjo e Joris 1995**). Pelo contrário, na apoptose ocorre uma condensação citoplasmática e nuclear. No nucléolo, a cromatina condensa-se em massas e desloca-se para a periferia nuclear que fragmenta (cariorréxis). Da periferia celular são emitidas protuberâncias contendo diversos organelos condensados. Essas protuberâncias tornam-se mais acentuadas, destacam-se para o espaço intercelular formando aí os corpos apoptóticos que por fim são endocitados por macrófagos. Do ponto de vista bioquímico, a apoptose caracteriza-se por uma fragmentação do DNA em segmentos específicos, inactivação mitocondrial e acidificação citoplasmática, sendo a fase efectora de todo este processo dependente da activação de uma cascata de proteases específicas, designadas por caspases, num mecanismo semelhante ao da cascata da coagulação (**Kerr e col. 1972; Manjo e Joris 1995; Engler e Gottlieb 1998**). É com base nessa fragmentação que se aplicam técnicas comuns de pesquisa da apoptose como o TUNEL, a electroforese do ADN e a citometria de fluxo (**Engler e Gottlieb 1998**).

Devido ao carácter selectivo da morte celular por apoptose, nos tecidos afectados pela sua ocorrência observa-se uma grande delecção celular com quase nenhuma distorção arquitectural. A expressão na superfície celular de certos marcadores, nomeadamente a fosfatidilserina, acompanha as alterações da membrana citoplasmática das células em apoptose, facto que permite o seu rápido reconhecimento e fagocitose, antes da libertação de factores celulares que actuam como mediadores da inflamação (actina e ADN), ao contrário do que sucede na necrose (**Engler e Gottlieb 1998**).

O desenvolvimento ou a regressão de uma população celular está assim dependente da interacção entre factores favorecedores da sobrevivência celular ou anti-apoptóticos e factores pró-apoptóticos (favorecedores da morte celular). Como exemplo do primeiro grupo citam-se hormonas (estrogénios, progesterona, gonadotrofinas e hormona de crescimento), citocinas (IL-1) e factores de crescimento (EGF/TGF-α, ILGF-1), ao passo que do segundo grupo fazem parte os androgénios, as hormonas libertadoras das gonadotrofinas e os seus análogos, certas citocinas (IL-6 e o TNF-α) e os radicais livres do oxigénio e do óxido nítrico (**Viatier e col. 1995;**

Hsueh e col. 1996; Billig e col. 1996; Homburg e Amsterdam 1998; Kiess e Gallaher 1998; Karbowski e col. 1999). É hoje aceite pela generalidade dos autores que a acção destes factores é geneticamente controlada, através da maior ou menor expressão celular de proto-oncogenes, nomeadamente dos da família Bcl-2/Bax (**Xavier 2002**).

O fenómeno da apoptose tem vindo a ganhar um protagonismo crescente na literatura científica mercê da sua participação no desenvolvimento e funcionamento de virtualmente todos os sistemas do organismo. O tamanho de uma determinada população celular depende do balanço entre a produção e a perda. A apoptose está envolvida na remodelação de muitos tecidos sãos, sendo exemplo disso a renovação celular que ocorre ao nível do fígado e da mucosa gastroduodenal (**Xavier 2002**). Exerce ainda um papel importante na involução e atrofia de muitos tecidos orgânicos, tal como acontece com o corpo amarelo humano em involução que caracteristicamente apresenta numerosos corpos apoptóticos (**Kerr e col. 1972**). É igualmente responsável pela perda celular espontânea que ocorre nas neoplasias. Nestas, encontram-se geralmente um grande número de mitoses e corpos apoptóticos, sendo a taxa de crescimento da lesão directamente dependente do balanço entre ambos. Após tratamento médico de uma neoplasia verifica-se um aumento dos fenómenos de apoptose, podendo esse "índice apoptótico" ser utilizado como uma medida da resposta do tumor à intervenção (**Kerr e col. 1972**). Pelo contrário, a desregulação da apoptose está envolvida no aparecimento de numerosos processos patológicos, nomeadamente de certos tumores, infecções víricas, doenças autoimunes e neurodegenerativas, imunodeficiência, infertilidade e provavelmente na endometriose. O aparecimento de fenómenos de apoptose em tecidos não passíveis de regeneração, nomeadamente no cérebro e miocárdio, conduz, como facilmente se compreende, a uma situação de doença (**Engler e Gottlieb 1998**).

Os actuais conhecimentos relativamente ao papel desempenhado pela apoptose e pelo sistema imunológico no aparelho genital feminino, tanto na homeostasia como no aparecimento de fenómenos patológicos nomeadamente ao nível do endométrio, conferem a este campo da investigação uma importância crescente (**Xavier 2002**).

O endométrio humano está sujeito ao mecanismo de regulação celular através da apoptose. Vários estudos têm demonstrado uma maior incidência deste processo de morte celular nas células endometriais durante a fase secretora intermédia e tardia do ciclo menstrual, relacionando-o com o início da descamação menstrual (**Otsuki e col. 1994; Gompel e col. 1994; Shikone e col. 1997; Mclaren e col. 1997; von Rango e col. 1998; Tschugguel e col. 1999**). Os proto-oncogenes da família Bcl-2/Bax são responsáveis pelo controlo da apoptose que ocorre

no endométrio humano, sendo os proto-oncogenes Bax e Bcl-x short favorecedores e os Bcl-2 e Bcl-x long inibidores da ocorrência desse fenómeno de morte celular. O endométrio normal apresenta uma população de células epiteliais glandulares com imunoreactividade equilibrada para ambos os proto-oncogenes durante a fase proliferativa e secretora inicial do ciclo, mas verifica-se uma diminuição da expressão Bcl-2 na fase secretora tardia e durante o período menstrual, passando então a haver um predomínio da população Bax-positiva. Ficam assim criadas as condições para que ocorra um aumento dos fenómenos de apoptose nestas últimas fases do ciclo (**Mclaren e col. 1997; von Rango e col. 1998; Tschugguel e col. 1999**).

É intuitivamente apelativo que a sobrevivência do tecido endometrial fora da cavidade uterina esteja associada a uma desregulação dos mecanismos que conduzem à morte celular programada pré-menstrual. Como já referido, os fenómenos de apoptose, secundários a um aumento dos factores pró-apoptóticos e/ou redução de factores anti-apoptóticos, encontram a sua maior expressão no endométrio pré-menstrual de mulheres não susceptíveis de desenvolver endometriose (**Otsuki e col. 1994; Gompel e col. 1994; Shikone e col. 1997; Mclaren e col. 1997; von Rango e col. 1998; Tschugguel e col. 1999**). Pelo contrário, nas mulheres susceptíveis de vir a desenvolver endometriose foi já demonstrada uma menor activação dos moduladores pró-apoptóticos e maior expressão de factores anti-apoptóticos, especialmente durante a fase secretora tardia do ciclo menstrual (**Dmowski e col. 2001**). Este achado parece indicar um aumento da viabilidade das células endometriais disseminadas para a cavidade peritoneal durante o fenómeno da menstruação retrógrada, facilitando assim a sua implantação e sobrevivência em localização ectópica (**Dmowski e col. 2001**). A observação de que a proporção de macrófagos peritoneais Bcl-2 positivos em mulheres com endometriose parece ser significativamente superior à encontrada nas mulheres sem esta doença, nas quais predominam os macrófagos Bax-positivos favorecedores da apoptose, pode igualmente explicar a maior capacidade de sobrevivência quer dos macrófagos peritoneais quer do tecido endometrial ectópico nas mulheres com endometriose, relativamente ao que acontece nas mulheres sem esta doença (**Mclaren e col. 1997**).

c. Défice de competência imunológica

Do que atrás foi dito, resulta claro que a sobrevivência e a proliferação das células endometriais ectópicas é altamente dependente dos fenómenos de angiogénese e de resistência à apoptose. Todavia, a fisiopatologia da endometriose é seguramente mais complexa do que o simples balanço entre estes dois processos celulares.

Segundo alguns autores, um défice de competência imunológica nas mulheres destinadas a desenvolver a doença facilitaria a implantação, persistência e progressão do tecido endometrial ectópico (**Oosterlynck e col. 1991; Taylor e col. 1997; Braun e Dmowski 1998; Lebovic e col. 2001; Seli e col. 2003**). Apesar de não estar totalmente esclarecido o processo pelo qual o organismo se liberta dos fragmentos de endométrio regurgitados para a cavidade pélvica durante a menstruação, admite-se que esteja envolvida não apenas a imunidade humoral mas também a celular. A endometriose caracterizar-se-ia então pela existência de uma disfunção em ambos os tipos de imunidade, embora não esteja ainda clarificada se essa disfunção é causa ou consequência da doença (**Seli e col. 2003**). O facto é que esse distúrbio imunológico parece contribuir decisivamente para o desenvolvimento das duas principais queixas associadas à endometriose: a dor e a infertilidade (**Seli e col. 2003**).

O aumento do número de células com funções imunitárias no líquido peritoneal de doentes com endometriose tem sido extensamente reportado desde a década de 80, sendo os macrófagos peritoneais o paradigma desse aumento (**Halme e col. 1983; Olive e col. 1985; Dunselman e col. 1988**). Poder-se-ia esperar que do aumento do número e da actividade destas células resultasse uma maior eficácia na eliminação dos fragmentos endometriais ectópicos, inibindo o desenvolvimento das lesões. Paradoxalmente, a esse aumento está associado uma promoção do crescimento do endométrio ectópico, provavelmente devido a um aumento da libertação de factores de crescimento e de citocinas, para além da disfunção intrínseca do próprio macrófago na sua actividade fagocítica (**Lebovic e col. 2001**). A sustentação dessa hipótese foi apresentada por **Surrey e Halme (1990)** que foram capazes de demonstrar que o crescimento de células endometriais em meio de cultura era promovido pela adição de líquido peritoneal de doentes com endometriose.

Não menos importante será seguramente o papel das células "natural killer" (NK) em todo este processo. Estas desempenham o papel de reconhecimento e destruição de células tumorais, células hospedeiras infectadas por vírus e linhas celulares não reconhecidas nos processos de transplantação (**Lebovic e col. 2001**). A diminuição da sua actividade, mais do que a diminuição do seu número, poderia estar associada a uma menor eficácia na depuração do tecido endometrial regurgitado para a cavidade peritoneal, facilitando assim o desenvolvimento das lesões de endometriose. **Oosterlynck e col. (1991)** foram os primeiros autores a demonstrar uma diminuição da actividade das células NK contra células endometriais autólogas em mulheres com endometriose, achado que inclusivamente correlacionaram com o estádio da doença. Mais tarde, o mesmo grupo de autores demonstrou que o liquido peritoneal de doentes com endometriose se caracterizava por uma maior actividade supressora das células NK, quando comparado com o de mulheres sãs, facto que mais uma vez sugere o envolvimento

de factores humorais solúveis (**Oosterlynck e col. 1993b**). Estes achados foram também identificados no soro de doentes com endometriose (**Kanzaki e col. 1992**). Mais recentemente foi demonstrado que as células NK de mulheres com a doença apresentavam uma maior expressão de receptores inibidores da actividade "killer", capazes de suprimir a actividade citotóxica destas células (**Wu e col. 2000**).

Do que atrás foi descrito resulta que o complexo circuito de fenómenos fisiopatológicos que sustentam o desenvolvimento da endometriose continua ainda longe duma clarificação satisfatória. Este facto justifica por si só a manutenção ou até um incremento da investigação que é realizada no âmbito desta doença.

Referências

Alcazar JL, Laparte C, Jurado M, Lopez-Garcia G. The role of transvaginal ultrasonography combined with color velocity imaging and pulsed Doppler in the diagnosis of endometriomas. Fertil Steril 1997; 67:487-91.

Aleem F, Pennisi J, Zeitoun K, Predanic M. The role of color Doppler in the diagnosis of endometriomas. Ultrasound Obstet Gynecol 1995; 5:51-4.

Andrade SP, Vieira LB, Bakhle YS, Piper PJ. Effect of platelet activating factor (PAF) on the formation of blood vessels in subcutaneous implants in mice. J Lipid Mediat Cell Signal 1994; 9:117-21.

Arumugan K, Lim JM. Menstrual characteristics associated with endometriosis. Br J Obstet Gynaecol 1997; 104:948-50.

Audebert A, Backstrom T, Barlow DH, Benagiano G, Brosens I, Buhler K, et al. Endometriosis 1991: a discussion document. Hum Reprod 1992; 7:432-5.

Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. Am J Pathol 1995; 147:339-51.

Barbieri RL. Endometriosis and the estrogen threshold theory: relation to surgical and medical treatment. J Reprod Med 1998; 43:287-92.

Behrens J. Cell contact, differentiation and invasiveness of epithelial cells. Invasion Metastasis 1995; 14:61-81.

Bergqvist A, Ljungberg O, Skoo L. Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium. Hum Reprod 1993; 8:1915-22.

Beyth Y, Yaffe H, Levij S, Sadovsky E. Retrograde seeding of endometrium: a sequel of tubal flushing. Fertil Steril 1975; 26:1094-7.

Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. Hum Reprod Update 1996; 2:103-17.

Braun DP, Dmowski WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. Curr Opin Obstet Gynecol 1998; 10:365-9.

Brosens IA. Classification of endometriosis revisited. Lancet 1993; 341:630.

Brosens IA, Puttemans PJ, Deprest J. The endoscopic localization of endometrial implants in the ovarian

chocolate cyst. Fertil Steril 1994; 61:1034-8.

Brosens IA. Is mild endometriosis a disease? Is mild endometriosis a progressive disease? Hum Reprod 1994; 9:2209-11.

Brosens J, Timmerman D, Starzinski-Powitz A, Brosens I. Noninvasive diagnosis of endometriosis: the role of imaging and markers. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:95-114.

Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. J Clin Invest 1997; 99:2851-7.

Bruner KL, Eisenberg E, Gorstein F, Osteen KG. Progesterone and transforming growth factor-beta coordinately regulate suppression of endometrial matrix metalloproteinases in a model of experimental endometriosis. Steroids 1999; 64:648-53.

Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumor necrosis factor-a. Med Hypoth 2003; 60:84-8.

Calhaz-Jorge C, Costa AP, Santos MC, Palma-Carlos ML. Soluble intercellular adhesion molecule 1 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis correlates with the extension of peritoneal implants. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003a; 106:170-4.

Calhaz-Jorge C, Costa AP, Santos MC, Palma-Carlos ML. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in patients with endometriosis depend on the severity of the disorder and are higher in the luteal phase. Hum Reprod 2003b; 18:593-7.

Carneiro F, Machado JC, Seruca R, Sobrinho-Simões M. E-cadherin changes in gastric carcinoma. Histopathology 1999; 5:477-8.

Cassina PC, Hauser M, Kacl G, Imthurn B, Schroder S, Weder W. Catamenial hemoptysis. Diagnosis with MRI. Chest 1997; 111:1447-50.

Chan AO, Chu KM, Lam SK, Wong BC, Kwok KF, Law S, et al. Soluble E-cadherin is an independent pretherapeutic factor for long-term survival in gastric cancer. J Clin Oncol 2003; 21:2288-93.

Clark AH. Endometriosis in a young girl. JAMA 1948; 136:690.

Coimbra H, Branco EC, Falcão F, Oliveira HM. Endometriose torácica. Acta Med Port 2000; 13:115-8.

Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. JAMA 1986; 355:1904-8.

Darai E, Leblanc M, Walker-Combrouze F, Bringuier AF, Madelenat P, Scoazrc JY. Expression of cadherins and CD44 isoforms in ovarian endometrial cysts. Hum Reprod 1998; 13:1346-52.

Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielezny MA, Michalek AM, Selman S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. Epidemiology 1993; 4:135-42.

Dechaud H, Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Degraffenreid LA, Schenken RS. Mesothelial cell-associated hyaluronic acid promotes adhesion of endometrial cells to mesothelium. Fertil Steril 2001; 76:1012-8.

Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. Hum Reprod 2001; 16:1802-8.

Dogan MM, Ugur M, Soysal SK, Soysal ME, Ekici E, Gokmen O. Transvaginal sonographic diagnosis of ovarian endometrioma. Int J Gynaecol Obstet 1996; 52:145-9.

Donnez J, Nisolle M, Smoes P, Gillet N, Beguin S, Casanas-Roux F. Peritoneal endometriosis and "endometriotic" nodules of the rectovaginal septum are two different entities. Fertil Steril 1996; 66:362-8.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998; 13:1686-90.

Donnez J, van Langendonckt A, Casanas-Roux F, van Gossum JP, Pirard C, Jadoul P, et al. Current thinking on the pathogenesis of endometriosis. Gynecol Obstet Invest 2002; 54 (Suppl 1):52-8.

Donnez J, Squifflet J, Casanas-Roux F, Pirard C, Jadoul P, van Langendonckt A. Typical and subtle atypical presentations of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:83-93.

Dorgan JF, Reichman ME, Judd JT, Brown C, Longcope C, Schatzkin A, et al. The relationship of body size to plasma levels of estrogens and androgens in premenopausal women. Cancer Causes Control 1995; 6:3-8.

dos Reis RM, de Sa MF, de Moura MD, Nogueira AA, Ribeiro JU, Ramos ES, et al. Familial risk among patients with endometriosis. J Assist Reprod Genet 1999; 16:500-3.

Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. J Reprod Fertil 1988; 82:707-10.

Engler RL, Gottlieb RA. Programmed cell death: apoptosis and cardiovascular disease. Dialog Cardiov Med 1998; 3: 67-81.

Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24:235-58.

Eskenazi B, Mocarelli P, Warner M, Samuels S, Vercellini P, Olive D, et al. Serum dioxin concentrations and endometriosis: a cohort study in Seveso, Italy. Environ Health Perspect 2002; 110:629-34.

Evers JL. Endometriosis does not exist; all women have endometriosis. Hum Reprod 1994; 9:2206-9.

Fasciani A, D'Ambrogio G, Bocci G, Monti M, Genazzani AR, Artini PG. High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata. Mol Hum Reprod 2000; 6:50-4.

Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. Nat Med 1998; 4:336-40.

Foster DC, Stern JL, Buscema J, Rock JA, Woodruff JD. Pleural and parenchymal pulmonary endometriosis. Obstet Gynecol 1981; 58:552-6.

Fukaya T, Sugawara J, Yoshida H, Murakami T, Yajima A. Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: original investigation and review of literature. Gynecol Obstet Invest 1999; 47(Suppl 1):11-7.

Gadducci A, Ferdeghini M, Cosio S, Annicchiarico C, Ciampi B, Bianchi R, et al. Preoperative serum E-cadherin assay in patients with ovarian carcinoma. Anticancer Res 1999; 19:769-72.

Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. Am J Pathol 1997; 150:461-7.

Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. Reprod 2002; 123:217-26.

Gofuku J, Shiozaki H, Doki Y, Inoue M, Hirao M, Fukuchi N, et al. characterization of soluble E-cadherin as a disease marker in gastric cancer patients. Br J Cancer 1998; 78:1095-101.

Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, et al. Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. Am J Pathol 1994; 144:1195-202.

Griffiths TR, Brotherick I, Bishop RI, White MD, McKenna DM, Horne CH, et al. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. Br J Cancer 1996; 74:579-84.

Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Infertility in women and moderate alcohol use. Am J Public Health 1994; 84:1429-34.

Groothuis PG, Koks CA, de Goeij AF, Dunselman GA, Arends JW, Evers JL. Adhesion of human endometrial fragments to peritoneum in vitro. Fertil Steril 1999; 71:1119-24.

Guerriero S, Ajossa S, Mais V, Risalvato A, Lai MP, Melis GB. The diagnosis of endometriomas using colour Doppler energy imaging. Hum Reprod 1998; 13:1691-5.

Guyton AC. Textbook of medical physiology. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986: 236.

Haas TA, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. Curr Opin Cell Biol 1994; 6:656-62.

Halme J, Becher S, Hammond MG, Raj MHG, Raj S. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1983; 145:333-7.

Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984; 64:151-4.

Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. Fertil Steril 2001; 76:1-10.

Hasson HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. J Reprod Med 1976; 16:135-40.

Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. Hum Reprod Update 1998; 4:736-40.

Holness C, Simmons DL. Structural motifs for recognition and adhesion in members of the immunoglobulin superfamily. J Cell Sci 1994; 107:2065-70.

Holt VL, Weiss NS. Recommendations for the design of epidemiologic studies of endometriosis. Epidemiology 2000; 11:654-9.

Homburg R, Amsterdam A. Polycystic ovary syndrome: loss of the apoptoic mechanism in the ovarian follicles? J Endocrinol Invest 1998; 21:552-7.

Hornstein MD, Barbieri RL. Endometriosis. In: Ryan KJ, Berkowitz RS, Barbieri RL, editors. Kistner's Gynecology and women's health. St. Louis: Mosby, 1999: 492-518.

Houston DE. Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race, and socioeconomic status. Epidemiol Rev 1984; 6:167-91.

Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H. Gonadal cell apoptosis. Recent Prog Horm Res 1996; 51:433-55.

Hu DE, Hiley CR, Fan TP. Comparative studies of the angiogenic activity of vasoactive intestinal peptide, endothelin-1 and -3 and angiotensin II in a rat sponge model. Br J Pharmacol 1996; 117:545-51.

Hughesdon PE. The structure of the endometrial cysts of the ovary. J Obstet Gynaecol Br Emp 1957; 44:481-7.

Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. Mol Hum Reprod 1997; 3:27-45.

Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. N Engl J Med 2001; 344:1904-9.

Hynes R. Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. Cell 1992; 69:11-25.

Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Tanikawa M, Terakawa N. Tumor necrosis factor-α promotes proliferation of the endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:824-9.

Jansen RPS, Russell P. Non-pigmented endometriosis: clinical laparoscopic and pathologic definition. Am J Obstet Gynecol 1986; 155:1154-9.

Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis. Including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. Cancer 1949:399-410.

Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenic implications of the anatomic distribution. Obstet Gynecol 1986; 67:335-8.

Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, Woolley DE. Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. J Reprod Fertil 1996; 107:43-51.

Jubanyik KJ, Comite F. Extrapelvic endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24:411-40.

Juhasz M, Ebert MP, Schulz HU, Rocken C, Molnar B, Tulassay Z, et al. Dual role of serum soluble E-cadherin as a biological marker of metastatic development in gastric cancer. Scand J Gastroenterol 2003; 38:850-5.

Kane AB. Redefining Cell Death. Am J Pathol 1995; 146:1-2.

Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1992; 167:257-61.

Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, Ostrowski M, Teranishi M, Nishizawa Y, et al. Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. Free Radic Biol Med 1999; 26:396-409.

Katayama M, Hirai S, Kamihagi K, Nakagawa K, Yasumoto M, Kato L. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. Br J Cancer 1994; 69:580-5.

Kaunitz A, Di Sant'Agnese PA. Needle tract endometriosis: an unusual complication of amniocentesis. Obstet Gynecol 1979; 54:753-5.

Keettel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. Am J Obstet Gynecol 1951; 61:440-2.

Kennedy S, Mardon H, Barlow D. Familial endometriosis. J Assist Reprod Genet 1995; 12:32-4.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26:239-57.

Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Eur J Endocrinol 1998; 138:482-91.

Kirshon B, Poindexter AN. Endometriosis in multiparous women. J Reprod Med 1989; 34:215-7.

Kleppinger RK. One thousand laparoscopies at a community hospital. J Reprod Med 1974; 13:13-7.

Koch PJ, Franke WW. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol 1994; 6:682-7.

Kokorine I, Marbay E, Henriet P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y, et al. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. J Cell Sci 1996; 109:2151-60.

Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbay E. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. Fertil Steril 1997; 68:246-51.

Koks CA, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL. Adhesion of shed menstrual tissue in an in-vitro model using amnion and peritoneum: a light and electron microscopic study. Hum Reprod 1999; 14:816-22.

Koks CA, Groothuis PG, Slaats P, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. Fertil Steril 2000; 73:604-12.

Koninckx PR, Martin D. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possible adenomyosis externa. Fertil Steril 1992; 58:924-8.

Koninckx PR. Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? Hum Reprod 1994; 9:2202-5.

Kruitwagen RFPM, Poels LG, Willemsen WNP, Jap PH, Thomas CM, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during early follicular phase. Fertil Steril 1991; 55:297-303.

Kumar-Singh S, Weyler J, Martin MJ, Vermeulen PB, van Marck E. Angiogenic cytokines in mesothelioma: a study of VEGF, FGF-1 and -2, and TGF beta expression. J Pathol 1999; 189:72-8.

Kupker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K. Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. Hum Reprod Update 1998; 4:719-23.

Laufer MR, Goitein L, Bush M, Cramer DW, Emans SJ. Prevalence of endometriosis in adolescent women

with chronic pelvic pain not responding to conventional therapy. J Pediatr Adolesc Gynecol 1997; 10:199-202.

Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. Fertil Steril 2001; 75:1-10.

Lee HS, Lee IS, Kang TC, Jeong GB, Chang SI. Angiogenin is involved in morphological changes and angiogenesis in the ovary. Biochem Biophys Res Commun 1999; 257:182-6.

Lessan K, Aguiar DJ, Oegema T, Siebenson L, Skubitz AP. CD44 and beta 1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. Am J Pathol 1999; 154:1525-37.

Lessey BA, Metzger DA, Haney AF, McCarty KS Jr. Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy. Fertil Steril 1989; 51:409-15.

Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis. An experimental study. Acta Obstet Gynecol Scand 1955; 34:366-98.

Liston WA, Bradford WP, Downie J, Kerr MG. Laparoscopy in a general gynaecological unit. Am J Obstet Gynecol 1972; 113:672-7.

Liu DTY, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. Br J Obstet Gynaecol 1986; 93:859-62.

Machado J, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. E-cadherin mutations in gastric carcinoma. J Pathol 2000; 191:466-8.

Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinomas. Oncogene 2001; 20:1525-8.

Mahnke JL, Dawood MY, Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril 2000; 73:166-70.

Mai KT, Yazdi HM, Perkins DG, Parks W. Development of endometriosis from embryonic duct remnants. Hum Path 1998; 29:319-22.

Mais V, Guerriero S, Ajossa S, Angiolucci M, Paoletti AM, Melis GB. The efficiency of transvaginal ultrasonography in the diagnosis of endometrioma. Fertil Steril 1993; 60:776-80.

Manjo G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146:3-15.

Martelli M, Campana A, Bischof P. Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. J Reprod Fertil 1993; 98:67-76.

Matorras R, Rodiquez F, Pijoan JI, Ramon O, Gutierrez-de-Teran G, Rodriguez-Escudero F. Epidemiology of endometriosis in infertile women. Fertil Steril 1995; 63:34-8.

Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, Okamura H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and in vitro experimental model. Gynecol Obstet Invest 1999, 47:18-20.

Mclaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. Hum Reprod 1996; 11:220-23.

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

Mclaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. Hum Reprod Update 2000; 6:45-55.

Merril JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. Am J Obstet Gynecol 1966; 94:780-90.

Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:1-19.

Modlich U, Kaup FJ, Augustin HG. Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. Lab Invest 1996; 74:771-80.

Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand 1993; 72:560-4.

Moen MH. Endometriosis in monozygotic twins. Acta Obstet Gynecol Scand 1994; 73:59-62.

Moen MH, Stokstad T. A long-term follow-up study of women with asymptomatic endometriosis diagnosed incidentally at sterilization. Fertil Steril 2002; 78:773-6.

Mungyer G, Willemsen WN, Rolland R, Vemer HM, Ramaekers FC, Jap PH, et al. Cell of the mucous membrane of the female genital tract in culture: a comparative study with regard to the histogenesis of endometriosis. In Vitro Cell Dev Biol 1987; 23:111-7.

Nagel TC, Kopher RA, Tagatz GE. Tubal reflux of endometrial tissue during hysteroscopy. In: Siegler AM, Lindemann HJ, editors. Hysteroscopy: principles and practice. Philadelphia: JB Lippincott 1984: 145.

Nisolle M. Peritoneal, ovarian and rectovaginal endometriosis are three distinct entities. (Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur), Université Catholique de Louvain, 1996.

Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three distinct entities. Fertil Steril 1997; 68:585-96.

Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. Fertil Steril 1997; 68:912-9.

Obermair A, Preyer O, Leodolter S. Angiogenesis in gynecology and obstetrics. Wien Klin Wochenschr 1999; 111:262-77.

Oliker AJ, Harris AE. Endometriosis of the bladder in a male patient. J Urol 1971; 106:858-9.

Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. Fertil Steril 1985; 44:772-7.

Olive DL, Henderson DY. Endometriosis and müllerian anomalies. Obstet Gynecol 1987; 69:412-5.

Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. Fertil Steril 1991; 56:45-61.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M, Koninckx PR. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. Fertil Steril 1993a; 59:778-82.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. Obstet Gynecol 1993b; 82:206-12.

Orre M, Rogers PA. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumors of the ovary. Int J Cancer 1999; 84:101-8.

Osteen KG, Bruner KL, Sharpe-Timms KL. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. Semin Reprod Endocrinol 1996; 14:247-55.

Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal human endometrium. Gynecol Obstet Invest 1999; 48:2-13.

Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y, Akao Y. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. Lancet 1994; 344:28-9.

Patel MD, Feldstein VA, Chen DC, Lipson SD, Filly RA. Endometriomas: diagnostic performance of US. Radiology 1999; 210:739-45.

Pauwels A, Schepens PJ, D'Hooghe T, Delbeke L, Dhont M, Brouwer A, et al. The risk of endometriosis and exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls: a case-control study of infertile women. Hum Reprod 2001; 16:2050-5.

Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. J Biol Chem 1997; 272:17097-103.

Peterson EP, Behrman SJ. Laparoscopy of the infertile patient. Obstet Gynecol 1970; 36:363-70

Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. Endocrinology 1990; 127:965-7.

Pinkert TC, Catlow CE, Straus R. Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. Cancer 1979; 43:1562-7.

Poncelet C, Leblanc M, Walker-Combrouze F, Soriano D, Feldmann G, Madelenat P, et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand 2002; 81:195-203.

Prentice A, Randall BJ, Weddell A, McGill A, Henry L, Horne CH, et al. Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: Endometrium and peritoneal mesothelium. Hum Reprod 1992; 7:1318-25.

Propst AM, Laufer MR. Endometriosis in adolescents. Incidence, diagnosis and treatment. J Reprod Med 1999; 44:751-8.

Ranscht B. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. Curr Opin Cell Biol 1994; 6:740-6.

Redmer DA, Reynolds LP. Angiogenesis in the ovary. Rev Reprod 1996; 1:182-92.

Redwine DB. Was Sampson wrong? Fertil Steril 2002; 78:686-93.

Reynolds K, Bicknell R. Angiogenesis in transvaginal colour Doppler. Bourne TH, Jauniaux E, Jurcovik D; Springer 1995; 13-9.

Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. J Anim Sci 1998; 76:1671-81.

Reynolds K, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. Int J Exp Pathol 2002; 83:151-63.

Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. Blood 1999; 93:2627-36.

Ridley JH, Edwards IK. Experimental endometriosis in the human. Am J Obstet Gynecol 1958; 76:783-90.

Ridley JH. The histogenesis of endometriosis: A review of facts and fancies. Obstet Gynecol Surv 1968; 23:1-35.

Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL. Endometriosis in rhesus monkeys (Macaca mulatta) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Fundam Appl Toxicol 1993, 21:433-41.

Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. J Biol Chem 1996; 271:28220-8.

Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. Curr Opin Cell Biol 1994; 6:663-73.

Rovito P, Gittleman M. Two cases of endometrioma in cesarean scars. Surgery 1986; 100:118-20.

Salamonsen LA, Wolley DE. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endometrial remodelling and menstruation. Reprod Med Rev 1996; 5:185-203.

Sanfilippo JS, Wakim NG, Schikler KN, Yussman MA. Endometriosis in association with uterine anomaly. Am J Obstet Gynecol 1986; 154:39-43.

Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN. Epidemiology of endometriosis among parous women. Obstet Gynecol 1995; 85:983-6.

Schrodt GR, Alcorn MO, Ibanez J. Endometriosis of the male urinary system: A case report. J Urol 1980; 124:722-3.

Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. Mol Hum Reprod 2000; 6:610-7.

Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:41-61.

Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:3112-8.

Shikone T, Kokawa K, Yamoto M, Nakano R. Apoptosis of human ovary and uterine endometrium during the menstrual cycle. Horm Res 1997; 48 (Suppl 3):27-34.

Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, et al. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. Cancer Res 1989; 49:2128-33.

Shirahama S, Furukawa F, Wakita H, Takigawa M. E- and P-cadherin expression in tumor tissues and soluble E-cadherin levels in sera of patients with skin cancer. J Dermatol Sci 1996; 13:30-6.

Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gytai-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. J Clin Invest

1993; 91:2235-43.

Signorello LB, Harlow BL, Cramer DW, Spiegelman D, Hill JA. Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study. Ann Epidemiol 1997; 7:267-74.

Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram Jr VC. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. Am J Obstet Gynecol 1980; 137:327-31.

Simpson JL, Bischoff FZ, Kamat A, Buster JE, Carson SA. Genetics of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:21-40.

Sobrinho-Simões M, Oliveira C. Different types of epithelial cadherin alterations play different roles in human carcinogenesis. Adv Anat Pathol 2002; 9:329-37.

Somigliana S, Vigano P, Gaffuri B, Guarneri D, Busacca M, Vigbali M. Human endometrial stromal cells as a source of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 molecules. Hum Reprod 1996; 11:1190-4.

Spuijbroek MD, Dunselman GA, Menheere PP, Evers JL. Early endometriosis invades the extracellular matrix. Fertil Steril 1992; 58:929-33.

Stauder R, Günthert U. CD44 isoforms. Impact on lymphocyte activation and differentiation. The Immunologist 1995; 3:78-83.

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with extracellular matrix during invasion and metastasis. Annu Rev Cell Biol 1993; 9:541-73.

Strobel T, Cannistra SA. Beta 1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. Gynecol Oncol 1999; 73:362-7.

Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. Fertil Steril 1982; 38:667-72.

Sundfeldt K, Ivarsson K, Rask K, Haeger M, Hedin L, Brannstrom M. Higher levels of soluble E-cadherin in cyst fluid from malignant ovarian tumours than in benign cysts. Anticancer Res 2001; 21:65-70.

Surrey ES, Halme J. Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. Obstet Gynecol 1990; 76:792-7.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991; 251:1451-5.

Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF. Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. Ann NY Acad Sci 1997; 828:194-207.

Truong K, Ikura M. The cadherin superfamily database. J Struct Funct Genomics 2002; 2:135-43.

Tschugguel W, Schneeberger C, Unfried G, Brautigam G, Stonek F, Wiser F et al. Elevation of inducible nitric oxide synthase activity in human endometrium during menstruation. Biol Reprod 1999; 60:297-304.

van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, van der Linden EP, Ramaekers FC, Evers JL. Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. Fertil Steril 1994; 61:85-90.

van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW, Evers JL. Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. Fertil Steril 1995; 63:1210-6.

van der Linden PJ. Cell adhesion, cell adhesion molecules and their functional role in the human endometrium. Early pregnancy 1996; 2:5-14.

van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW, Evers JL. Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes. Fertil Steril 1996; 65:76-80.

van Schil PE, Vercauteren SR, Vermeire PA, Nackaerts YH, Van Marck EA. Catamenial pneumothorax caused by thoracic endometriosis. Ann Thorac Surg 1996; 62:585-6.

Vercellini P, Aimi G, De Giorgi O, Maddalena S, Carinelli S, Crosignani PG. Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? Br J Obstet Gyneacol 1998; 105:1018-21.

Vercellini P, Aimi G, Panazza S, Vicentini S, Pisacreta A, Crosignani PG. Deep endometriosis conundrum: evidence in favour of a peritoneal origin. Fertil Steril 2000; 73:1043-6.

Vercellini P, Frontino G, Pietropaolo G, Gattei U, Daguati R, Crosignani PG. Deep endometriosis: definition, pathogenesis, and clinical management. J Am Assoc Gynecol Laparosc 2004; 11:153-61.

Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. BMJ 1993; 306:182-4.

Viatier D, Dufour P, Tordjeman-Rizzi, Prolongeau JF, Depret-Moser S, Monnier JC. Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1995; 63:155-68.

Vignali M, Infantino M, Matrone R, Chiodo I, Somigliana E, Busacca M, et al. Endometriosis: novel ethiopathogenetic concepts and clinical perspectives. Fertil Steril 2002; 78:665-78.

Volpi E, De Grandis T, Zuccaro G, La Vista A, Sismondi P. Role of transvaginal ultrasonography in the detection of endometriomata. J Clin Ultrasound 1995; 23:163-7.

von Rango U, Classen-Linke I, Krusche CA, Beier HM. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. Hum Reprod 1998; 13:3177-89.

Xavier P. Angiogénese Folicular. Será a sua identificação importante no tratamento da infertilidade? Arq

Med 2000; 14:48-51.

Xavier P. Apoptose e reprodução humana. Acta Med Port 2002; 15:287-91.

Xavier P, Beires J, Belo L, Rebelo I, Martinez-de-Oliveira J. Angiogénesis endometrial. ¿Qué valor tiene en el estudio de la endometriosis? Rev Iberoam Fertil Reprod Hum 2004a; 21:29-33.

Xavier P, Beires J, Martinez-de-Oliveira J. Sub and endometrial blood flow in patients with endometriosis. Hum Reprod 2004b; 19(Suppl.1):i168.

Xavier P. Endometriose. Diferentes formas de apresentação ou mais que uma doença? Arq Med 2004; 18:103-7.

Wittich AC. Endometriosis in an episiotomy scar: Review of the literature and report of case. J Am Osteopath Assoc 1982; 82:22-3.

Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. Clin Obstet Gynecol 1999; 42:566-85.

Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Schenken RS. Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. Fertil Steril 1999; 71:56-60.

Witz CA, Takahashi A, Montoya-Rodriguez IA, Cho S, Schenken RS. Expression of the alpha-2/beta-1 and alpha-3/beta-1 integrins at the surface of mesothelial cells: a potential attachment site of endometrial cells. Fertil Steril 2000; 74:579-84.

Witz CA, Thomas MR, Montoya-Rodriguez IA, Nair AS, Centonze VE, Schenken RS. Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. Fertil Steril 2001; 75:385-90.

Wu MY, Yang JH, Chao KH, Hwang JL, Yang YS, Ho HN. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. Fertil Steril 2000; 74:1187-91.

Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis 2003. Am J Reprod Immunol 2003; 49:285-96.

Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. Gynecol Endocrinol 1997; 11:371-81.

Yan Z, Neulen J, Raczek S, Weich HA, Keck C, Grunwald K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. Gynecol Endocrinol 1998; 12:149-53.

Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such endometriosis. Hum Reprod 2002; 17:1415-23.

CAPÍTULO 3

Estudo da vascularização endometrial com recurso à angiografia Doppler

3.1. Introdução e definição de objectivos

Descrita pela primeira vez nos finais do século XIX por von Recklinghausen (**Brosens 1993**), a endometriose continua a desafiar os investigadores que se dedicam ao esclarecimento da sua fisiopatologia. A teoria da menstruação retrógrada é a que descreve de uma forma mais compreensível os mecanismos que conduzem à doença, tendo-se tornado por isso na mais popular entre a comunidade científica e clínica. No entanto, não tem sido capaz de esclarecer o porquê de apenas algumas mulheres desenvolverem a doença, apesar da regurgitação de tecido endometrial para a cavidade pélvica durante a menstruação ser praticamente universal (**Halme e col. 1984; Liu e Hitchcock 1986**). **Halme e col. (1984) e Liu e Hitchcock (1986)** identificaram este fenómeno em 90 e 76%, respectivamente, das mulheres sem endometriose submetidas a procedimentos cirúrgicos pélvicos durante o período menstrual. Uma possível explicação para as diferenças encontradas entre a prevalência do fenómeno da menstruação retrógrada e o desenvolvimento da endometriose em toda a sua plenitude poderá residir nas características do endométrio eutópico das mulheres que virão a desenvolver a doença (**Donnez e col. 1998; Healy e col. 1998**): quando comparado com o de mulheres saudáveis mostrou um maior potencial para se implantar e desenvolver fora da cavidade uterina, fenómeno esse favorecido por uma disfunção endometrial associada a uma actividade angiogénica excessiva (**Donnez e col. 1998; Healy e col. 1998; Fasciani e col. 2000; Xavier e col. 2004a**).

O endométrio humano caracteriza-se, do ponto de vista funcional, por uma resposta a estímulos hormonais provenientes do ovário que condicionam o aparecimento de modificações cíclicas na sua estrutura histológica tendo por objectivo a criação das condições necessárias para que ocorra a implantação do blastocisto. São estes os pressupostos que compõem o ciclo endometrial, descrito pela primeira vez em 1908 por Hitschmann e Adlerl (**Rogers 1996**).

O aporte vascular do endométrio é proveniente das artérias uterinas e ováricas que penetram obliquamente na espessura do miométrio até alcançar o seu terço médio (**DuBose e col. 1985; Rogers 1996**) (Figura 3.1). A este nível ramificam-se num plano paralelo ao da sua superfície, passando a designar-se por artérias arqueadas (**DuBose e col. 1985; Rogers 1996**). A emissão de ramificações a partir das artérias arqueadas em ângulo recto em direcção ao endométrio origina as artérias radiais (**DuBose e col. 1985; Rogers 1996**). O fluxo sanguíneo para o endométrio é proveniente das artérias radiais que se ramificam ao passar na junção miométrio-endométrio. Essas ramificações designam-se por artérias basais ou endometriais e

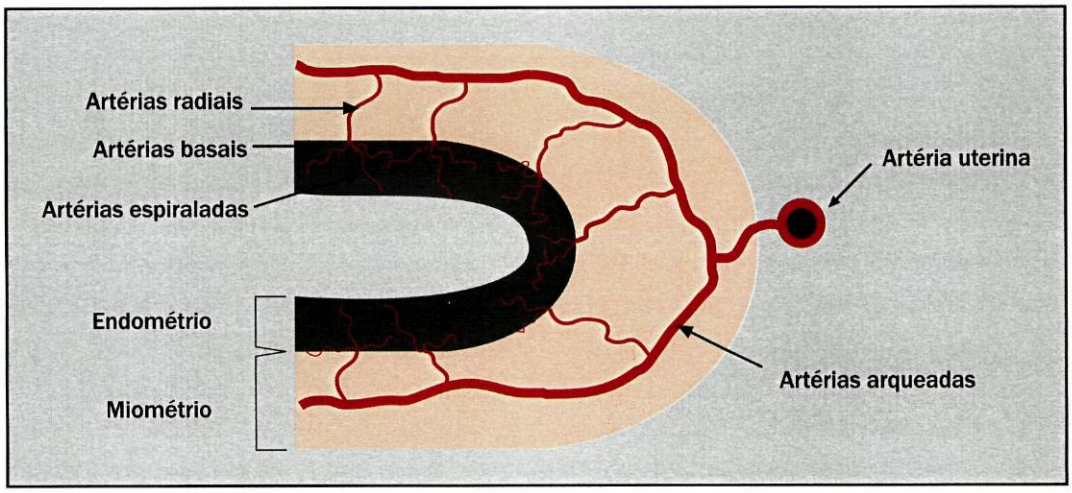


Figura 3.1: Esquema representativo do aporte vascular ao endométrio.

são os vasos directamente responsáveis pelo aporte sanguíneo à camada basal do endométrio (**DuBose e col. 1985; Rogers 1996; Chien e col. 2002**). Depois de originarem as artérias basais as artérias radiais progridem em direcção à superfície do endométrio e passam a designar-se por artérias espiraladas. Estes são os vasos que proporcionam a vascularização ao terço superficial e a quase toda a extensão do terço médio do endométrio (**DuBose e col. 1985; Chien e col. 2002**). Ao contrário das artérias basais, as artérias espiraladas são constituídas por paredes sensíveis à acção hormonal evidenciando uma resposta fundamentalmente vasoconstritora (**DuBose e col. 1985**). As artérias basais são vasos de menor calibre e extensão, insensíveis à actividade hormonal e atingem apenas a camada basal do endométrio ou a porção mais externa do seu terço médio (**DuBose e col. 1985**).

O endométrio e a sua vascularização têm sido objecto de múltiplos estudos. A introdução na prática clínica das sondas endovaginais para exame ultrasonográfico permitiu melhorar a definição morfológica dos órgãos pélvicos com especial ênfase para o endométrio (**Böhm-Velez e Mendelson 1992; Fleischer e col. 1997**). No entanto, para além da morfologia, representada essencialmente pela espessura e padrão sonográfico, é possível ainda uma avaliação funcional, proporcionada pelo estudo das variações da sua perfusão sanguínea (**Fanchin 2001**).

O advento da tecnologia Doppler, sobretudo após o aparecimento da codificação de cores e do power Doppler, também designado angiografia Doppler, veio impulsionar o estudo da perfusão sanguínea dos órgãos genitais (**Rubin e col. 1994; Kurjak e col. 1997**). A definição

dos padrões da arquitectura vascular do ovário ao longo do ciclo menstrual foi já determinada com base na angiografia Doppler (**Beires 1999**), facto que permitiu confirmar ser este método um meio capaz de efectuar, neste órgão reprodutivo, um estudo simultaneamente morfológico e funcional, ou seja morfofuncional. A sua aplicação ao endométrio tem sido descrita na área da infertilidade, designadamente no estudo da relação entre a perfusão sanguínea e a receptividade da mucosa uterina (**Yang e col. 1999; Contart e col. 2000; Kupesic e col. 2001; Chien e col. 2002**). A eventual demonstração por esta via duma disfunção endometrial na endometriose, ou por outras palavras, a existência duma maior actividade angiogénica no endométrio de mulheres afectadas, constitui um desafio empolgante por duas razões fundamentais: em primeiro lugar porque há uma manifesta necessidade de clarificar os mecanismos etiopatogénicos da endometriose e em segundo lugar porque não há, nesta área, estudos científicos consistentes. O facto da angiografia Doppler estar já validada para o estudo da perfusão sanguínea endometrial (**Applebaum 1995; Salle e col. 1998; Yang e col. 1999; Chien e col. 2002**), justifica, no nosso entender, a sua aplicação às doentes com endometriose.

Foi, assim, nosso objectivo estudar com angiografia Doppler a vascularização (sub e intraendometrial) ao longo do ciclo menstrual em mulheres com e sem endometriose, de forma a estabelecer um padrão funcional vascular do endométrio nesses dois grupos.

3.2. População e Métodos

3.2.1. Selecção da população estudada

Foram recrutadas para o estudo 30 mulheres com suspeita de endometriose e 17 outras presumivelmente saudáveis que frequentavam a consulta de Ginecologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de São João. Essas mulheres, com idades compreendidas entre os 19 e os 37 anos, constituíram-se, pois, em dois grupos: com endometriose e de referência. O principal critério utilizado para a selecção das mulheres com endometriose foi o da identificação de pelo menos um endometrioma ovárico num exame ultrasonográfico transvaginal (Figura 3.2), na ausência de qualquer outra entidade médica ou ginecológica

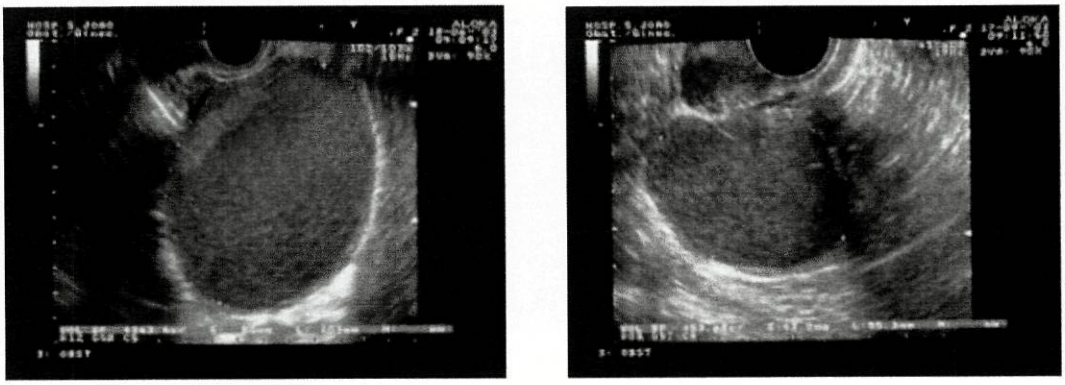


Figura 3.2: Imagens representativas de endometriomas obtidas por ultrasonografia transvaginal. De realçar o padrão típico do conteúdo da lesão caracterizado por ecos internos difusos de baixa intensidade.

associada. A inclusão final das participantes no grupo com endometriose ficou condicionada à confirmação do diagnóstico através da realização de laparoscopia e exame histológico do produto de biópsia da lesão. Essa confirmação foi conseguida em todos os casos pelo que não houve qualquer doente excluída por esse motivo.

As participantes seleccionadas para o grupo de referência foram recrutadas entre mulheres propostas para esterilização cirúrgica per-laparoscópica ou para investigação de uma infertilidade conjugal de causa inexplicada. Em todos estes casos excluiu-se a presença de endometriose durante a realização da laparoscopia.

Para além dos critérios de selecção inicial, foram adoptadas as seguintes condições a aplicar a todas as mulheres participantes: [1] ausência de exposição a qualquer tratamento hormonal ou à acção de um dispositivo intra-uterino nos três meses que antecederam o início do estudo; [2] regularidade dos ciclos menstruais, definida pela presença de interlúnios com duração entre 28 a 30 dias e de cataménios com duração entre dois e cinco dias; [3] confirmação da ovulação e de uma fase luteínica adequada no ciclo durante o qual se realizou o estudo ultrasonográfico, pela observação de uma valor de progesterona sérica superior a 8.00 ng/mL entre o 21° e o 23° dia (**Hull e col. 1982; Silva-Carvalho 1995**).

Das mulheres inicialmente seleccionadas como controlos duas foram excluídas por não ter sido possível confirmar a ovulação e a fase luteínica adequada no ciclo durante o qual se realizou o estudo (valor de progesterona sérica inferior a 8.00 ng/mL entre o 21° e o 23° dia). Não foi excluída nenhuma das doentes do grupo "endometriose" tendo então restado para análise 45 participantes: 30 no grupo com endometriose e 15 no de referência.

Catorze doentes (46.7%) com o diagnóstico confirmado de endometriose tinham uma história de infertilidade (ausência de gravidez após mais de 12 meses de actividade sexual regular sem contracepção) com a endometriose como único factor identificado. No grupo de controlo seis (40.0%) mulheres apresentavam uma história de infertilidade conjugal de causa inexplicada.

Todas as participantes no estudo foram devidamente esclarecidas e deram o seu consentimento por escrito, de acordo com as recomendações da Comissão de Ética do Hospital de São João, à qual foi submetido.

3.2.2. Desenho do estudo

Cada uma das 45 participantes foi submetida durante o ciclo menstrual a quatro observações ultrasonográficas, o que perfaz um total de 180. Os exames foram realizados com intervalos de sete dias, tendo o primeiro sido efectuado sistematicamente entre o terceiro e o quinto dia do ciclo. Desta forma todas foram submetidas a um exame em cada fase do ciclo menstrual de acordo com o seguinte critério:

. Fase proliferativa inicial: dia 1 ao dia 7 do ciclo.
. Fase proliferativa tardia: dia 8 ao dia 14 do ciclo.
. Fase secretora inicial: dia 15 ao dia 21 do ciclo
. Fase secretora tardia: dia 22 ao dia 28-30 do ciclo.

Pode desde já referir-se que o dia médio de realização do exame em cada fase do ciclo foi similar nos dois grupos (Tabela 3.1).

Entre o 21º e o 23º dia do ciclo menstrual uma amostra de sangue venoso foi colhida de cada uma das participantes para determinação da concentração de progesterona sérica, que foi realizada com base num ensaio radioimunoenzimático (RIA) utilizando para tal o "kit" Coat-A-Count Progesterone comercializado pelo fabricante DPC Inc. (Los Angeles, USA) e seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.3. Estudo ultrasonográfico

Os exames ultrasonográficos foram realizados na Unidade de Ecografia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de São João, sempre pelo mesmo operador (P.X.).

Foi utilizado um único aparelho Aloka SSD 5000 (Japão) com power Doppler, equipado com sonda vaginal de 5 MHz (UST-9118), com ângulo de 120° e filtro passa-alto de 50 Hz. Os exames foram sistematicamente efectuados após um repouso de 15 minutos entre as 8 e as 9 horas da manhã para excluir os efeitos do ritmo circadiano no fluxo sanguíneo (**Zaidi e col. 1995**). Iniciou-se o exame ultrasonográfico com a obtenção de uma imagem longitudinal do útero ao longo do seu maior eixo, permitindo dessa forma a identificação do endométrio. A sua espessura foi medida segundo o método da dupla camada e definida como a maior distância entre as duas interfaces endométrio-miométrio (Figura 3.3). De seguida, estudaram-se com power Doppler as regiões sub e intraendometrial que foram definidas em conformidade com as descrições de **Scoutt e col. (1991) e de Tetlow e col. (1999)**. À região intraendometrial correspondeu então a área sonográfica compreendida entre as duas margens hiperecogénicas do endométrio, ao passo que à região subendometrial correspondeu uma fina camada hipoecogénica que rodeia toda a cavidade uterina e que é delimitada internamente pela margem hiperecogénica do endométrio (**Scoutt e col. 1991; Tetlow e col. 1999**) (Figura 3.3).



Figura 3.3: Imagem ultrasonográfica do maior eixo longitudinal do útero. À espessura do endométrio correspondeu a maior distância entre as duas interfaces endométrio-miométrio. A região intraendometrial está representada pela área compreendida entre as duas margens hiperecogénicas do endométrio, ao passo que à região subendometrial correspondeu uma fina camada hipoecogénica que rodeia a cavidade uterina e separa as áreas hiperecogénicas do endométrio e do miométrio (setas).

Para efeitos do estudo e seguindo as recomendações de **Chien e col. (2002)**, considerámos como limite externo da região subendometrial uma linha imaginária localizada 5 mm para fora da margem hiperecogénica do endométrio.

O pulso de frequência foi escolhido para uma velocidade de cor < 4 cm/s e o ganho de cor foi ajustado para 80% ± 2% de modo a optimizar a detecção de fluxo nos pequenos vasos e minimizar os artefactos relacionados com o movimento. Estas definições foram padronizadas de forma a serem aplicadas em todos os exames. A presença ou ausência de sinais de cor nestas duas regiões foi então observada no início e no final da exploração que teve uma duração mínima de 15 minutos a fim de permitir a análise durante vários ciclos cardíacos.

A classificação adoptada para classificar os padrões de distribuição do fluxo sub e intraendometrial foi a proposta e validada por **Chien e col. (2002)** e que passamos a descrever:

. **Padrão A:** ausência de sinais de cor tanto na região sub como na intraendometrial (Figura 3.4).

. **Padrão B:** presença de sinais de cor na região subendometrial e ausência na intraendometrial (Figura 3.5).

. **Padrão C:** presença simultânea de sinais de cor em ambas as regiões (Figura 3.6).

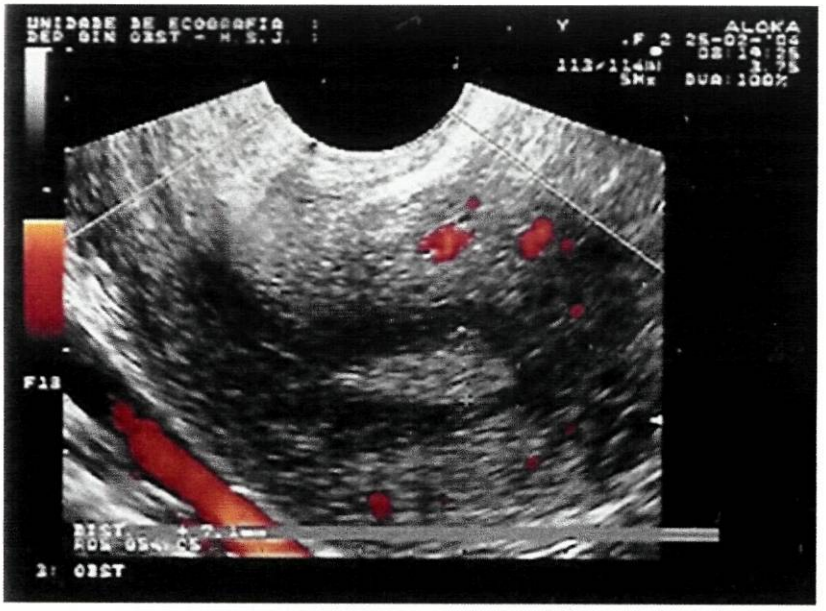


Figura 3.4: Imagem representativa do padrão vascular do tipo A caracterizado pela ausência de sinais de cor na região sub e intraendometrial.

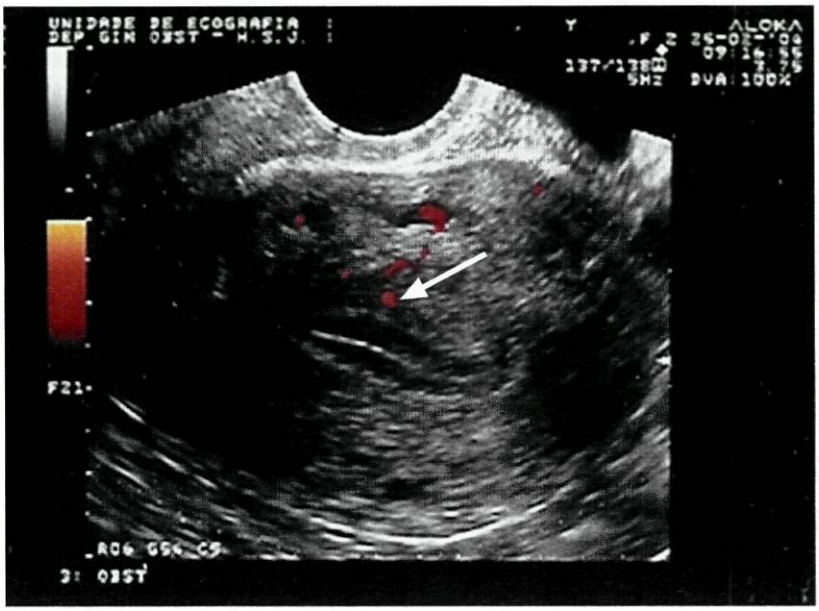


Figura 3.5: Imagem representativa do padrão vascular do tipo B caracterizado pela presença de sinais de cor na região subendometrial (seta) mas ausência na região intraendometrial.

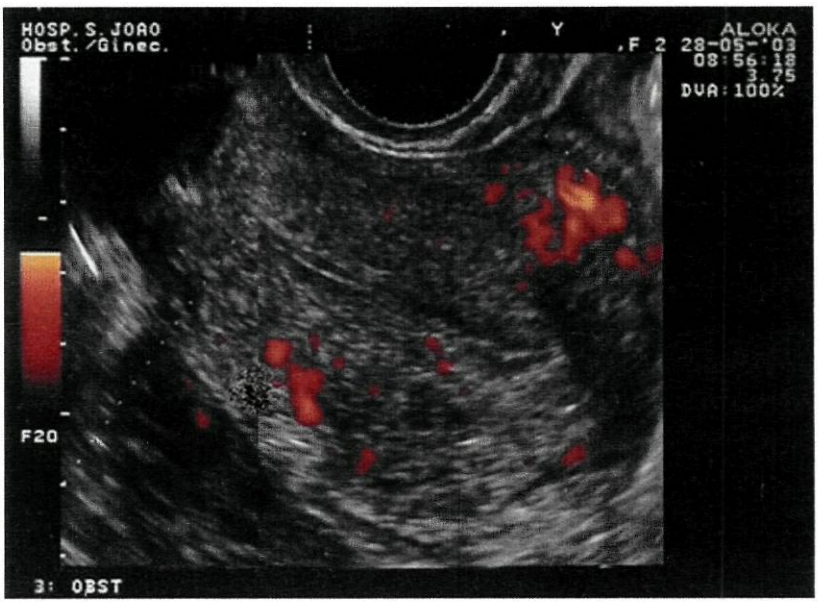


Figura 3.6: Imagem representativa do padrão vascular do tipo C caracterizado pela presença de sinais de cor na região sub e intraendometrial (setas).

No caso de se observarem diferentes padrões durante a realização do exame optou-se sempre por aquele com maior número de sinais de cor. De forma a permitir comparar os fluxos sanguíneos observados nos diferentes exames atribuímos um valor numérico a cada padrão: valor 1 para o padrão A, 2 para o padrão B e 3 para o padrão C. Desse modo foi possível criar o que designamos por índice de vascularização para cada exame ultrasonográfico e um índice de vascularização médio para cada um dos dois grupos estudados.

3.2.4. Análise estatística

A análise estatística dos resultados baseou-se na utilização, conforme apropriado, dos testes Wilcoxon ou Kruskal-Wallis para comparação de variáveis quantitativas.

Os resultados relativos ao dia do ciclo em que se realizou o exame, à espessura do endométrio, à idade e ao índice de massa corporal das participantes no estudo estão expressos em média ± desvio padrão. Os restantes resultados são apresentados como média ± erro padrão. As proporções foram comparadas com base na utilização do teste do qui-quadrado ou no teste exacto de Fisher quando apropriado.

Considerou-se como estatisticamente significativo um valor de $P < 0.05$.

3.3. Resultados

Tal como já referido anteriormente, a metodologia ultilizada permitiu que o dia médio de realização do exame ultrasonográfico fosse similar nos dois grupos (Tabela 3.1).

Fase do ciclo	Endometriose	Controlo	P
Proliferativa inicial	4.0 ± 1.7	4.3 ± 2.0	0.703
Proliferativa tardia	10.9 ± 1.7	11.2 ± 2.1	0.676
Secretora inicial	18.1 ± 1.8	18.2 ± 2.1	0.877
Secretora tardia	25.1 ± 2.4	25.6 ± 2.7	0.577

Tabela 3.1: Dia de realização do exame ultrasonográfico (média ± desvio padrão) em cada um dos grupos e para cada fase do ciclo.

No que diz respeito à análise da variação do valor médio do índice de vascularização dentro de cada um dos grupos de participantes, observámos um aumento do seu valor da fase proliferativa para a fase secretora em ambos os grupos. Quando comparados entre os dois grupos, as mulheres com endometriose apresentaram um valor médio do índice de vascularização significativamente mais elevado na fase secretora tardia do ciclo menstrual (2.1 vs. 1.5, P=0.035) (Tabela 3.2 e Figura 3.7).

Fase do ciclo	Endometriose (n=30)	Controlo (n=15)	P
Proliferativa inicial	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.736
Proliferativa tardia	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.800
Secretora inicial	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.348
Secretora tardia	2.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.035

Tabela 3.2: Valor do índice de vascularização para cada um dos grupos estudados nas diferentes fases do ciclo menstrual. Resultados expressos em média ± erro padrão.

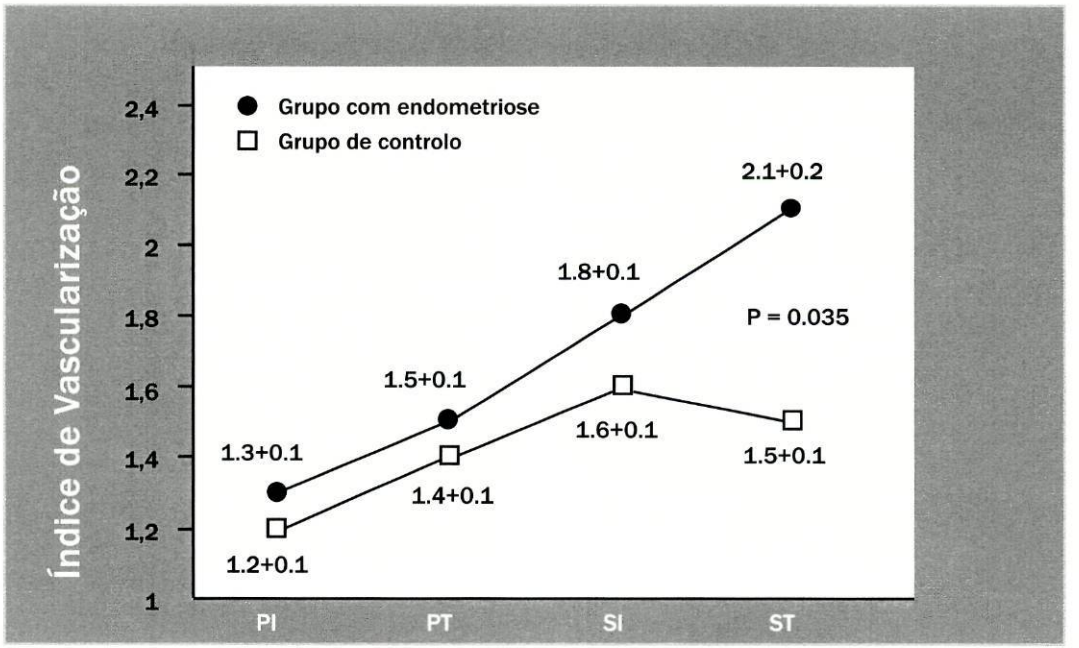


Figura 3.7: Evolução dos índices de vascularização ao longo do ciclo (média ± erro padrão). Nota: PI = fase proliferativa inicial; PT = fase proliferativa tardia; SI = fase secretora inicial; ST = fase secretora tardia.

Observámos uma proporção semelhante de mulheres em ambos os grupos com sinais de cor nas três primeiras fases do ciclo quando as regiões sub e intraendometriais foram analisadas separadamente. Todavia, foi observada uma proporção significativamente maior de doentes com sinais de cor durante a fase secretora tardia do ciclo na região intraendometrial (36.7% vs. 6.7%; P=0.038) e um valor próximo da significância na região subendometrial (73.3% vs. 46.7%; P=0.152) (Tabela 3.3).

Efectuámos igualmente uma análise comparativa dos valores médios dos índices de vascularização ao longo do ciclo menstrual entre as subpopulações de mulheres com endometriose associada ou não a infertilidade conjugal, assim como entre as mulheres do grupo de referência com e sem infertilidade conjugal. Os índices para essas subpopulações foram semelhantes dentro de cada um dos grupos e para cada uma das fases do ciclo (Tabelas 3.4 e 3.5).

A espessura do endométrio em cada uma das fases do ciclo foi semelhante entre os dois grupos em estudo (Tabela 3.6).

Fase do ciclo	Endometriose (n=30) (%)	Controlo (n=15) (%)	P
Proliferativa inicial			
Região subendometrial	6 (20.0)	2 (13.3)	0.699
Região intraendometrial	2 (6.7)	2 (6.7)	0.999
Proliferativa tardia			
Região subendometrial	13 (43.3)	6 (40.0)	0.915
Região intraendometrial	1 (3.3)	0 (0.0)	0.999
Secretora inicial			
Região subendometrial	21 (70.0)	8 (53.3)	0.440
Região intraendometrial	3 (10.0)	1 (6.7)	0.999
Secretora tardia			
Região subendometrial	22 (73.3)	7 (46.7)	0.152
Região intraendometrial	11 (36.7)	1 (6.7)	0.038

Tabela 3.3: Proporção de mulheres de cada um dos grupos com sinais de cor na região sub e intraendometrial para cada uma das fases do ciclo menstrual.

Fase do ciclo	Endometriose e infertilidade Sim (n=14)	Endometriose e infertilidade Não (n=16)	P
Proliferativa inicial	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	NS *
Proliferativa tardia	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	NS *
Secretora inicial	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.2	NS *
Secretora tardia	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	NS *

Tabela 3.4: Comparação dos índices de vascularização ao longo do ciclo menstrual nas subpopulações de mulheres com endometriose associada ou não a infertilidade conjugal. Resultados expressos em média ± erro padrão. * P > 0.100

Fase do ciclo	Controlo e infertilidade Sim (n=6)	Controlo e infertilidade Não (n=9)	P
Proliferativa inicial	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	NS *
Proliferativa tardia	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	NS *
Secretora inicial	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.2	NS *
Secretora tardia	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2	NS *

Tabela 3.5: Comparação dos índices de vascularização ao longo do ciclo menstrual nas subpopulações de mulheres do grupo de controlo com e sem infertilidade conjugal. Resultados expressos em média ± erro padrão. * P > 0.100

Fase do ciclo	Endometriose (n=30)	Controlo (n=15)	P
Proliferativa inicial	4.0 ± 1.7	3.9 ± 2.1	0.861
Proliferativa tardia	7.6 ± 2.2	7.4 ± 2.0	0.769
Secretora inicial	10.3 ± 2.8	9.5 ± 2.2	0.297
Secretora tardia	10.6 ± 3.1	9.8 ± 2.6	0.396

Tabela 3.6: Espessura do endométrio ao longo do ciclo em cada um dos grupos estudados. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Não encontrámos diferenças com significado estatístico entre as duas populações de mulheres no que diz respeito à idade (19-37 vs. 25-35 anos) ou ao índice de massa corporal (19.4-26.1 vs. 18.4-29.8 Kg/m2) (Tabela 3.7).

	Endometriose (n=30)	Controlo (n=15)	P
Idade (anos)	29.03 ± 3.7	30.13 ± 4.5	0.828
IMC (Kg/m2)	22.06 ± 3.0	23.40 ± 3.6	0.211

Tabela 3.7: Idade e índice de massa corporal (IMC) das populações estudadas. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

3.4. Discussão

Na sequência dos estudos que propuseram a hipótese da disfunção angiogénica endometrial como mecanismo relevante na etiopatogénese da endometriose (**Donnez e col. 1998; Healy e col. 1998**), tivemos por objectivo avaliar a vascularização endometrial ao longo do ciclo menstrual em mulheres com e sem endometriose, recorrendo à angiografia Doppler.

Os principais achados do nosso estudo foram a observação de um valor médio do índice de vascularização (que definimos) mais elevado na fase secretora tardia em mulheres com endometriose e uma maior proporção destas mulheres com sinais de cor na região intraendometrial também na fase secretora tardia do ciclo menstrual.

Antes de passarmos à análise mais detalhada dos resultados obtidos, pensámos ser oportuna uma reflexão crítica sobre algumas das opções metodológicas que efectuámos. Desde logo a escolha da angiografia Doppler como método ultrasonográfico para a realização deste estudo merece ser comentada. A informação fornecida pelo exame Doppler de um fluxo sanguíneo ao nível do aparelho genital pode ser interpretada sob uma perspectiva quantitativa ou qualitativa (**Beires 1999**). A aplicação da análise quantitativa ao estudo da perfusão endometrial, através do índice de pulsatilidade ou de Gosling, ou do índice de resistência de Pourcelot, ou ainda da medida directa do pico de velocidade máxima apresenta claras limitações (**Friedler e col. 1996; Tekay e col. 1996; Beires 1999; Yuval e col. 1999; Chien e col. 2002**): por um lado a medida dos índices em questão é imprecisa quando o fluxo sanguíneo não é contínuo durante o ciclo cardíaco como acontece na artéria uterina e na circulação endometrial e, por outro, a medida directa do pico da velocidade máxima, apesar de traduzir de uma forma mais real o fluxo sanguíneo, é mais difícil de ser avaliada uma vez que é dependente do ângulo de insonorização e do diâmetro do vaso em estudo, parâmetros altamente limitativos em leitos vasculares pequenos e tortuosos (**Evans e col. 1989; Beires 1999**). Outra explicação para a má correlação entre a verdadeira perfusão endometrial e os índices de resistência ou de pulsatilidade da artéria uterina resulta do facto da perfusão total deste vaso não reflectir a perfusão endometrial, uma vez que também irriga a porção superior da vagina, o ovário e a trompa de Falópio ipsilateral (**Schwartz e col. 1997; Yang e col. 1999; Chien e col. 2002**). Para além disso, o principal compartimento uterino é constituído pelo miométrio e não pelo endométrio, circunstância elucidativa para que se compreenda que a maior parte do fluxo sanguíneo que passa na artéria

uterina nunca atinja o endométrio (**Schwartz e col. 1997; Yang e col. 1999; Chien e col. 2002**). A análise qualitativa da informação fornecida pelo exame Doppler é a mais interessante e resume-se à análise espectral (representação das frequências Doppler com análise dos perfis de velocidade de determinado fluxo) ou à avaliação da cor na zona estudada (**Beires 1999**). As tentativas de aplicação da análise espectral à estimativa da perfusão endometrial revelaram-se contudo frustrantes (**Zaidi e col. 1995, Yuval e col. 1999**), pelo que hoje se aceita que a melhor estimativa para essa perfusão se obtém através da análise dos sinais de cor na área endometrial (**Applebaum 1995; Salle e col. 1998; Yang e col. 1999; Chien e col. 2002**). A eficácia da análise qualitativa da perfusão sanguínea endometrial baseada na análise dos sinais de cor só foi possível após o advento da técnica de power Doppler, também designada por angiografia Doppler (**Rubin e col. 1994; Kurjak e col. 1997**). A angiografia Doppler transforma a energia total do sinal Doppler em cor (**Evans e col. 1989**) e resulta da reflexão das ondas ultrasónicas a partir dos eritrócitos arteriais, arteriolares, venulares e venosos, representando, com uma estimativa muito aproximada, a vascularização total de um tecido num determinado momento (**Rubin e col. 1994; Amso e col. 2001**). A intensidade da cor aumenta em função do incremento da energia, permitindo obter uma representação bidimensional do vaso a estudar que se sobrepõe a uma imagem em modo B, perdendo-se no entanto informação sobre a velocidade e sentido do fluxo (**Rubin e col. 1994**). As vantagens que apresenta em relação ao Doppler a cores são evidentes, uma vez que é três a cinco vezes mais sensível, é independente do ângulo de insonorização e não é perturbada por fenómenos de "aliasing" (**Taylor e col. 1996; Beires 1999**). Por outro lado, os artefactos de cor, responsáveis por dificuldades na interpretação da imagem de Doppler a cores, são facilmente distinguíveis do verdadeiro fluxo quando se utiliza a angiografia Doppler (**Amso e col. 2001**). A análise qualitativa da perfusão sanguínea tecidular com recurso a esta tecnologia tem-se revelado de grande utilidade quando aplicada ao estudo de fluxos sanguíneos de baixa velocidade, nomeadamente ao nível da vascularização intramiometrial e endometrial onde a velocidade de fluxo é próxima do zero (**Jain e col. 1991; Beires 1999**), permitindo a realização de estudos clínicos com uma baixa variabilidade intra e inter-observador (**Evans e col. 1989; Yang e col. 1999; Schild e col. 2000; Amso col. 2001; Basir e col. 2002; Chien e col. 2002**). **Basir e col. (2002)** observaram um coeficiente de variação intra e inter-observador de 6%, ao passo que nos estudos de **Chien e col. (2002)** a variabilidade intra-observador foi de 7.8%. Segundo **Amso e col. (2001)**, a questão da variabilidade intra e inter-observador dos estudos com power Doppler está intimamente associada à variabilidade das imagens ultrasonográficas. Recomendam, por isso, que a duração do exame permita assegurar uma análise durante vários ciclos cardíacos, facto que por si só melhora a sua reprodutibilidade. Outro factor que parece contribuir decisivamente para a baixa variabilidade

intra-observador dos estudos qualitativos com power Doppler quando aplicados ao endométrio é a possibilidade de facilmente se padronizar o plano e a área a estudar (**Amso e col. 2001**). Estas características da angiografia Doppler e as suas vantagens relativamente aos outros métodos de análise ultrasonográfica para perfusão endometrial justificam, em nosso entender, a escolha que efectuámos.

Outra opção metodológica deste estudo que nos parece dever ser comentada relaciona-se com os critérios de selecção das participantes. No que diz respeito à selecção dos casos, o principal obstáculo com que nos deparámos relacionou-se com a definição da endometriose que reconhecidamente levanta questões de difícil resolução quando se planeia um estudo caso-controlo (**Zondervan e col. 2002; Missmer e Cramer 2003**). A endometriose quando definida pela presença de tecido endometrial funcionante (glândulas e estroma) implantado fora da cavidade corporal uterina permite que nela se incluam mulheres com um largo espectro de sintomas e achados anátomo-patológicos (**Missmer e Cramer 2003**). Esta excessiva flexibilidade da definição chega ao ponto de admitir como casos mulheres totalmente assintomáticas aquando da realização de uma cirurgia pélvica por motivos não relacionados com a doença (**Missmer e Cramer 2003**). No entanto, uma entidade clínica, quando analisada numa perspectiva de saúde pública, só adquire relevo se provoca sintomas ou resulta em morbilidade com impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos na qual é diagnosticada (**Zondervan e col. 2002**). Este foi o motivo que levou alguns dos mais consagrados especialistas na área da endometriose a sugerir por consenso que o diagnóstico da doença deva ser definido, não apenas pela presença de endométrio ectópico, mas também pela evidência de que as lesões são activas (**Audebert e col. 1992**), podendo essa actividade ser definida pela presença de lesões infiltrativas (> 5 mm de profundidade de invasão), de endometriomas ou de aderências pélvicas não atribuíveis a outras causas (**Missmer e Cramer 2003**). Para minimizar o risco de inclusão incorrecta de casos considera-se igualmente que só devem ser seleccionados aqueles com diagnóstico de endometriose confirmado por laparoscopia, técnica que é desde há longo tempo reconhecida como a de eleição para aquela finalidade (**Duleba 1997; Pardanani e Barbieri 1998**). No nosso estudo os casos foram seleccionados com base na detecção ultrasonográfica de pelo menos um endometrioma, diagnóstico posteriormente confirmado por laparoscopia e exame histológico dos produtos de biópsia das lesões encontradas.

Alguns desvios na interpretação dos nossos resultados poderiam ter resultado da reconhecida associação entre a endometriose e a infertilidade (**Xavier e col. 2002; Navarro e col. 2003**). Uma maior perfusão sanguínea do endométrio associa-se a uma maior receptividade

e, desse modo, a uma maior probabilidade da ocorrência de gravidez (**Friedler e col. 1996; Yang e col. 1999; Contart e col. 2000; Schild e col. 2000; Kupesic e col. 2001; Chien e col. 2002; Xavier e col. 2004b**). Uma vez que a prevalência de infertilidade nas mulheres com endometriose é superior à da população geral (**Navarro e col. 2003**), tendo essa prevalência atingido os 46,7% no nosso grupo de doentes, decidimos incluir no grupo de controlo uma proporção semelhante de mulheres com infertilidade de causa inexplicada de modo a controlar o possível efeito da infertilidade na perfusão sanguínea endometrial. Esta metodologia por nós utilizada permitiu que dentro de cada um dos dois grupos de participantes fosse possível comparar a perfusão endometrial nas subpopulações com e sem infertilidade associada. Tanto no grupo de doentes como no grupo de controlo encontrámos resultados similares, independentemente de terem ou não infertilidade. Esta observação levou-nos a concluir que a possível influência da infertilidade na vascularização endometrial não foi responsável pelas diferenças encontradas nos índices de vascularização em mulheres com e sem endometriose.

Uma questão adicional que merece ser analisada devido ao seu potencial impacto nos resultados obtidos é a da contribuição de cada uma das regiões sonográficas estudadas para o total de perfusão endometrial. De acordo com a descrição de estudos de correlação entre os achados imagiológicos e os histológicos, a região sonográfica subendometrial, também designada por halo subendometrial ou zona juncional do miométrio, é representada pela camada mais interna do miométrio (**Scoutt e col. 1991; Tetlow e col. 1999**). Quando comparada com as camadas mais externas verificou tratar-se de um compartimento distinto, composto por um conjunto de células musculares com maior justaposição e de vascularização mais intensa (**Scoutt e col. 1991; Tetlow e col. 1999**). Numa perspectiva puramente anatómica conclui-se então que a região subendometrial é parte integrante do miométrio e não do endométrio. No entanto, considerando que o fluxo sanguíneo para o endométrio passa obrigatoriamente por esta região, a análise da perfusão subendometrial deve naturalmente ser incluída em estudos onde o objectivo seja determinar a vascularização endometrial (**Chien e col. 2002**). Em conformidade com estas considerações estão os dados da literatura que mostram uma maior exactidão na análise da perfusão sanguínea para o endométrio quando se combinam os parâmetros fluxométricos das duas regiões em comparação com a sua avaliação individual (**Friedler e col. 1996; Yang e col. 1999; Contart e col. 2000**). Estes dados levaram **Chien e col. (2002)** a sugerir que a estimativa da perfusão endometrial deva ser efectuada considerando essas duas regiões como um todo, sugestão que utilizamos no nosso estudo através da utilização de um índice de vascularização que integrou dados de ambas. Todavia, mesmo após estas reflexões, julgamos manter-se a necessidade de dissecar a contribuição de cada uma dessas

regiões para o total da perfusão endometrial. Esta nossa prudência resulta do facto de ter sido demonstrado que a região subendometrial apresenta uma espessura aumentada nas doentes com endometriose devido à frequente presença em simultâneo de lesões de adenomiose subendometrial (**Kunz e col. 2000; Piver e col. 2004**). A presença destas lesões pode conferir à região subendometrial um acréscimo de sinais de cor uma vez que apresentam actividade angiogénica objectivamente demonstrável (**Schindl e col. 2001**), desvirtuando desse modo a interpretação do índice de vascularização nas doentes com endometriose. No entanto, foi igualmente demonstrado que o endométrio das doentes com adenomiose não apresenta uma maior actividade angiogénica do que o de mulheres sem doença (**Schindl e col. 2001**). Para estabelecermos um controlo sobre esse possível factor de enviesamento dos nossos resultados, decidimos estudar, nos dois grupos de participantes, a proporção de mulheres com sinais de cor em cada uma das duas regiões sonográficas. Desta análise resultou a observação de uma proporção significativamente maior de mulheres com endometriose que evidenciaram sinais de cor durante a fase secretora tardia do ciclo na região intraendometrial e um valor próximo da significância na região subendometrial. Estes resultados demonstram que o achado de índices de vascularização mais elevados nas mulheres com endometriose em fase secretora tardia do ciclo não pode ser atribuído à presença simultânea de adenomiose subendometrial uma vez que, conforme já referido, esta não interfere com a actividade angiogénica da região intraendometrial. Podemos contudo admitir que possa ter tido alguma influência no resultado se considerarmos isoladamente a perfusão subendometrial.

As alterações da vascularização do endométrio ao longo de um ciclo natural em mulheres saudáveis têm sido extensamente estudadas com base na análise sonográfica das ondas de fluxo tanto na artéria uterina como nas artérias espiraladas (**Goswamy e Steptoe 1988; Steer e col. 1995; Bourne e col. 1996; Kurjak e col. 1997**). Essa análise mostrou uma diminuição da resistência ao fluxo, inversamente relacionado com a perfusão tecidular, da fase proliferativa para a secretora, atingindo os seus valores mais baixos durante a "janela de implantação" em plena fase secretora (**Goswamy e Steptoe 1988; Kurjak e col. 1991; Steer e col. 1995; Bourne e col. 1996**). Em concordância com estas observações também encontrámos um aumento da perfusão endometrial da fase proliferativa para a secretora nas mulheres saudáveis. No que diz respeito às mulheres com endometriose, não encontrámos dados na literatura relativos à avaliação Doppler, quantitativa ou qualitativa, da perfusão endometrial ao longo do ciclo. No entanto **Healy e col (1998)** e **Donnez e col. (1998)** foram os primeiros autores a demonstrar, por métodos imuno-histoquímicos, que o endométrio eutópico das doentes com endometriose apresenta uma maior actividade angiogénica e, dessa forma, uma disfunção potencialmente

contributiva para a etiopatogénese da endometriose. **Donnez e col. (1998)** foram particularmente decisivos na sustentação dessa hipótese ao observar uma maior expressão imuno-histoquímica do potente factor angiogénico "vascular endothelial growth factor" (VEGF) no epitélio glandular eutópico de mulheres com endometriose em fase secretora tardia do ciclo menstrual, ao contrário do que acontece nas mulheres saudáveis em que a expressão do seu receptor VEGFR-2, principal mediador da acção angiogénica, é máxima nas fases proliferativa tardia e secretora inicial (**Meduri e col. 2000; Malamitsi-Puchner e col. 2004**). Por outro lado, uma correlação positiva entre a perfusão sanguínea endometrial e a expressão do VEGF foi já estabelecida (**Ferrara e Davis-Smyth 1997; Agrawal e col. 1999; Jinno e col. 2001**). O VEGF é um factor angiogénico que actua directamente nas células endoteliais para induzir a sua proliferação e a angiogénese (**Folkman e Klagsbrun 1987; Folkman e Shing 1992; Gordon e col. 1995**). Para além desse efeito, este factor é também capaz de induzir uma acção vasodilatadora mediada pela libertação de prostaciclina e óxido nítrico pelas células endoteliais (**Smith 1998**). Sendo assim, a demonstração por **Donnez e col. (1998)** de um aumento da expressão endometrial do VEGF na fase secretora tardia do ciclo menstrual em mulheres com endometriose, sugere que, nestas doentes, um aumento do fluxo sanguíneo endometrial (por vasodilatação e/ou por neovascularização), possa ocorrer imediatamente antes da menstruação. Esta hipótese foi confirmada no nosso estudo pela observação de um aumento dos sinais de cor em doentes na fase secretora tardia do ciclo.

Uma outra possível explicação para o aumento da perfusão endometrial em doentes com endometriose seria a da ocorrência de uma vasodilatação da sua microvasculatura resultante da resistência do endométrio à acção da progesterona, uma particularidade atribuída a doentes com endometriose. Tendo em conta a existência de uma correlação positiva entre o estradiol e a vasodilatação endometrial (**Rogers 1996**), correlação essa contrariada por acção da progesterona, a resistência endometrial à progesterona resultaria numa acção sem oposição do estradiol sobre os vasos sanguíneos, aumentando dessa forma a perfusão endometrial. No entanto, os vários estudos efectuados para explicar as bases moleculares da resistência à progesterona nas doentes com endometriose mostraram que esta é uma característica do endométrio ectópico mas não do eutópico, este último objecto de análise na nossa investigação (**Prentice e col. 1992; Bergqvist e Ferno 1993; Attia e col. 2000**). Parece-nos, pois, pouco provável que a hipótese da resistência à progesterona tenha sido a responsável pelos resultados por nós encontrados. Pelo contrário, o aumento da perfusão endometrial nas doentes em fase secretora tardia sugere uma maior actividade angiogénica e consequentemente um aumento da neovascularização e da vasodilatação.

De acordo com a teoria da menstruação retrógrada o endométrio eutópico após regurgitação para a cavidade pélvica e adesão ao mesotélio peritoneal necessita de estabelecer uma vascularização rica para sobreviver e resultar no desenvolvimento da endometriose (**Healy e col. 1998; Donnez e col. 1998; Witz 1999; McLaren 2000; Fasciani e col. 2000**). A observação de uma excessiva actividade angiogénica no endométrio eutópico pré-menstrual nas doentes com endometriose sustenta a hipótese do seu maior potencial para a implantação e proliferação fora da cavidade uterina (**Donnez e col. 1998**). No nosso estudo, as mulheres com endometriose para além do aumento da vascularização endometrial da fase proliferativa para a secretora apresentaram um maior índice de vascularização endometrial, sobretudo à custa da região intraendometrial, na fase secretora tardia do ciclo, ou seja, imediatamente antes da menstruação. Estes resultados para além de originais apoiam a hipótese do envolvimento da disfunção angiogénica endometrial na etiopatogénese da endometriose.

Em conclusão, a angiografia Doppler aplicada ao estudo da vascularização endometrial é capaz de detectar fenómenos de neovascularização ou vasodilatação excessiva, permitindo evoluir de uma simples avaliação morfológica para uma avaliação simultaneamente morfológica e funcional, ou seja, morfofuncional (**Xavier e col. 2004c**). Esta tecnologia poderá ser utilizada na detecção de disfunção endometrial angiogénica, factor contributivo para o desenvolvimento da endometriose.

Referências

Agrawal R, Conway GS, Sladkevicius P, Payne NN, Bekir J, Campbell S, et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in the normal menstrual cycle: association with changes in ovarian and uterine Doppler blood flow. Clin Endocrinol 1999; 50:101-6.

Amso NN, Watermeyer SR, Pugh N, O'Brien S, D'Angelo A. Quantification of power Doppler energy and its future potential. Fertil Steril 2001; 76:583-7.

Applebaum M. The uterine biophysical profile. Ultrasound Obstet Gynecol 1995; 5:67-8.

Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:2897-902.

Audebert A, Backstrom T, Barlow DH, Benagiano G, Brosens I, Buhler K, et al. Endometriosis 1991: a discussion document. Hum Reprod 1992; 7:432-5.

Basir GS, Lam TP, O W, Chau MT, Ng EH, Ho PC. Cycle-to-cycle variation in utero-ovarian hemodynamic indices in ovarian stimulation and natural cycles of the same women and its effect on the outcome of assisted reproduction treatment. Fertil Steril 2002; 78:1055-60.

Beires J. Avaliação Doppler do fluxo sanguíneo ovárico. Padrões de arquitectura vascular ao longo do ciclo. (Dissertação de Doutoramento), Faculdade de Medicina do Porto 1999.

Bergqvist A, Ferno M. Oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison of different cycle phases and ages. Hum Reprod 1993; 8:2211-7.

Böhm-Vélez M, Mendelson EB. Transvaginal Sonography: Applications, Equipment, and Technique. In Nyberg David A, Hill Lyndon M, Böhm-Vélez M, et al. Transvaginal Ultrasound. Mosby Year Book, 1992:1-20.

Bourne TH, Hagström HG, Granberg S, Josefsson B, Hahlin M, Hellberg P, et al. Ultrasound studies of vascular and morphological changes in the human uterus after a positive self-test for the urinary luteinizing hormone surge. Hum Reprod 1996; 11:369-75.

Brosens IA. Classification of endometriosis revisited. Lancet 1993; 341:630.

Chien L, Au H, Chen P, Xiao J, Tzeng C. Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 2002; 78:245-51.

Contart P, Baruffi RL, Coelho J, Mauri AL, Peterson C, Franco JG Jr. Power Doppler endometrial evaluation as a method for the prognosis of embryo implantation in an ICSI program. J Assist Reprod Genet 2000;

17:329-34.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998; 13:1686-90.

DuBose TJ, Hill LW, Hennigan HW Jr, Nichols DH, Mezaraups GG, Porter L, et al. Sonography or arcuate uterine blood vessels. J Ultrasound Med 1985; 4:229-33.

Duleba AJ. Diagnosis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24:331-45.

Evans DH, McDicken WN, Skidmore R. The origin of the Doppler power spectrum. In: Evans DH, McDicken WN, eds. Doppler Ultrasound: Physics, Instrumentation, and Clinical Applications. John Wiley and Sons Inc: Chichester 1989:115-43.

Fanchin R. Assessing uterine receptivity in 2001: ultrasonographic glances at the new millennium. Ann NY Acad Sci 2001; 943:185-202.

Fasciani A, D'Ambrogio G, Bocci G, Monti M, Genazzani AR, Artini PG. High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata. Mol Hum Reprod 2000; 6:50-4.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocrinol Rev 1997; 18:4-25.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science 1987; 23:442-7.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992; 5:10931-4.

Fleischer AC, Applebaum MI, Parsons AK. Transvaginal sonography of the normal endometrium. In: Fleischer AC, Kurjak A, Granberg S. Ultrasound and the endometrium. The Parthenon Publishing Group, 1997: 1-16.

Friedler S, Schenker JG, Herman A, Lewin A. The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review. Hum Reprod Update 1996; 2:323-35.

Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB. Angiogenesis in the human female reproductive tract. Obstet Gynecol Surv 1995; 50:688-97.

Goswamy RK, Steptoe PC. Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles. Hum Reprod 1988; 3:721-6.

Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984; 64:151-4.

Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. Hum Reprod Update

1998; 4:736-40.

Hull MG, Savage PE, Bromham DR, Ismael AA, Morris AF. The value of a single serum progesterone measurement in the midluteal phase as a criterion of a potentially fertile cycle ("ovulation") derived from treated and untreated conception cycles. Fertil Steril 1982; 37:355-60.

Kupesic S, Bakavac I, Bjelos D, Kurjak A. Assessment of endometrial receptivity by transvaginal color Doppler and three-dimensional power Doppler ultrasonography in patients undergoing in vitro fertilization procedures. J Ultrasound Med 2001; 15:89-94.

Kurjak A, Kupesic-Urek S, Schulman H, Zalud I. Transvaginal color Doppler in the assessment of ovarian and uterine blood flow in infertile women. Fertil Steril 1991; 56:870-3.

Kurjak A, Kupesic S, Babic MM. Color Doppler assessment of endometrial blood flow. In: Fleischer AC, Kurjak A, Granberg S. Ultrasound and the endometrium. The Parthenon Publishing Group, 1997:87-96.

Kunz G, Beil D, Huppert P, Leyendecker G. Structural abnormalities of the uterine wall in women with endometriosis and infertility visualized by vaginal sonography and magnetic resonance imaging. Hum Reprod 2000; 15:76-82.

Jain SP, Fan PH, Philpot EF, Jain SP, Fan PH, Philpot EF, et al. Influence of various instrument settings on the flow information derived from the power mode. Ultrasound Med Biol 1991; 17:49-54.

Jinno M, Ozaki T, Iwashita M, Nakamura Y, Kudo A, Hirano H. Measurement of endometrial tissue blood flow: a novel way to assess uterine receptivity for implantation. Fertil Steril 2001; 76:1168-74.

Liu DTY, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. Br J Obstet Gynaecol 1986; 93:859-62.

Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, Stavreus-Evers A, Tzonou A, Landgren BM. Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles. Fertil Steril 2004; 81:1322-7.

Mclaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. Hum Reprod Update 2000; 6:45-55.

Meduri G, Bausero P, Perrot-Applanat M. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. Biol Reprod. 2000; 62:439-47.

Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:1-19.

Navarro J, Garrido N, Remohí J, Pellicer A. How does endometriosis affect infertility? Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:181-92.

Pardanani S, Barbieri RL. The gold standard for the surgical diagnosis of endometriosis: visual findings or biopsy results. J Gynecol Tech 1998; 4:121-4.

Piver P, Maubon A, Kapella M, Gana J, Paulhac S, Aubard Y. MRI uterine junctional zone thickness predicts IVF failure. Hum Reprod 2004; 19(Suppl.1):i37.

Prentice A, Randall BJ, Weddell A, McGill A, Henry L, Horne CH, et al. Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: Endometrium and peritoneal mesothelium. Hum Reprod 1992; 7:1318-25.

Rogers PAW. Structure and function of endometrial blood vessels. Hum Reprod Update 1996; 2:57-62.

Rubin JM, Bude RO, Carson PL, Bree RL, Adler RS. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. Radiol 1994; 190:853-6.

Salle B, Bied-Damon V, Benchaib M, Desperes S, Gaucherand P, Rudigoz RC. Preliminary report of an ultrasonography and colour Doppler uterine score to predict uterine receptivity in an in-vitro fertilization programme. Hum Reprod 1998; 13:1669-73.

Schild RL, Holthaus S, d'Alquen J, Fimmers R, Dorn C, van der Ven H, et al. Quantitative assessment of subendometrial blood flow by three-dimensional ultrasound is an important predictive factor in an in vitro fertilization program. Hum Reprod 2000; 15:89-94.

Schindl M, Birner P, Obermair A, Kiesel L, Wenzl R. Increased microvessel density in adenomyosis uteri. Fertil Steril 2001; 75:131-5.

Schwartz LB, Chiu AS, Courtney M, Krey L, Schmidt-Sarosi C. The embryo versus endometrium controversy revisited as it relates to predicting pregnancy outcome in in-vitro fertilization-embryo transfer cycles. Hum Reprod 1997; 12:45-50.

Scoutt LM, Flyn SD, Luthringer DJ, McCauley TR, McCarthy SM. Junctional zone of the uterus: correlation of MR imaging and histologic examination of hysterectomy specimens. Radiol 1991; 179:403-7.

Silva-Carvalho JL. Endométrio e função ovárica. Aspectos morfológicos e histeroscópicos. (Dissertação de Doutoramento), Faculdade de Medicina do Porto 1995.

Smith SK. Angogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. Hum Reprod Update 1998; 4:509-19.

Steer CV, Tan SL, Dillon D, Mason BA, Campbell S. Vaginal color Doppler assessment of uterine artery impedance correlates with immunohistochemical markers of endometrial receptivity required for the implantation of an embryo. Fertil Steril 1995; 63:101-8.

Taylor GA, Ecklund K, Dunning PS. Renal cortical perfusion in rabbits: visualization with colour amplitude

imaging and an experimental microbubble-based US contrast agent. Radiol 1996; 201:125-9.

Tekay A, Martikainen H, Jouppila P. The clinical value of transvaginal colour Doppler ultrasound in assisted reproductive technology procedures. Hum Reprod 1996; 11:1589-91.

Tetlow RL, Richmond I, Manton DJ, Greenman J, Turnbull LW, Killick SR. Histological analysis of the uterine junctional zone as seen by transvaginal ultrasound. Ultrasound Obstet Gynecol 1999; 14:188-93.

Xavier P, Rebelo C, Calejo L, Martinho M, Beires J, Bernardes J, et al. Avaliação prospectiva da taxa de gravidez após cirurgia laparoscópica em mulheres inférteis por endometriose. Rev Ginecol Med Reprod 2002; 27:63 (resumo).

Xavier P, Beires J, Belo L, Rebelo I, Martinez-de-Oliveira J. Angiogénesis endometrial. ¿Qué valor tiene en el estudio de la endometriosis? Rev Iberoam Fertil Reprod Hum 2004a; 21:29-33.

Xavier P, Gamboa C, Calejo L, Silva J, Stevenson D, Nunes A, et al. A randomised study of GnRH antagonist (cetrorelix) versus agonist (busereline) for controlled ovarian stimulation. Effect on safety and efficacy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004b (in press).

Xavier P, Beires J, Martinez-de-Oliveira J. Sub and endometrial blood flow in patients with endometriosis. Hum Reprod 2004c; 19(Suppl.1):i168.

Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. Clin Obstet Gynecol 1999; 42:566-85.

Yang JH, Wu MY, Chen CD, Jiang MC, Ho HN, Yang YS. Association of endometrial blood flow as determined by a modified color Doppler technique with subsequent outcome on in-vitro fertilization. Hum Reprod 1999; 14:1606-10.

Yuval Y, Lipitz S, Dor J, Achiron R. The relationships between endometrial thickness, and blood flow and pregnancy rates in in-vitro fertilization. Hum Reprod 1999. 14:1067-71.

Zaidi J, Jurkovic D, Campbell S, Okokon S, Tan SL. Circadian variation in uterine artery blood flow indices during the follicular phase of the menstrual cycle. Ultrasound Obstet Gynecol 1995; 5:406-10.

Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such endometriosis. Hum Reprod 2002; 17:1415-23.

CAPÍTULO 4

Estudo de marcadores séricos e plasmáticos ao longo do ciclo

4.1. Introdução e definição de objectivos

A dificuldade na compreensão da fisiopatologia da endometriose resulta na aplicação de estratégias de diagnóstico e tratamentos de eficácia questionável. Torna-se por isso fundamental aprofundar o conhecimento sobre os diferentes mecanismos etiopatogénicos que têm sido implicados no desenvolvimento da doença. A hipótese do envolvimento inflamatório e disfuncional angiogénico tem sido defendida com consistência, podendo mesmo explicar o porquê de só algumas mulheres com menstruação retrógrada virem a desenvolver a doença (**Viniater e col. 1996; Donnez e col. 1998; Healy e col. 1998**). Por outro lado, a interacção entre as células endometriais regurgitadas e o mesotélio peritoneal, constitui, segundo alguns autores, o fenómeno chave para a ocorrência de implantação e invasão celular (**Spuijbroek e col. 1992; van der Linden e col. 1996; Gaetje e col. 1997; Witz e col. 1999**).

A importância da angiogénese, definida em termos genéricos como a formação de novos capilares a partir da vasculatura pré-existente, é desde há muito reconhecida na fisiologia dos tecidos humanos (**Reynolds e Bicknell 1995**). No entanto, a sua disfunção tem igualmente sido associada a vários processos patológicos, dos quais a sustentação do crescimento de processos tumorais é claramente o paradigma (**Augustin e col. 1995; Redmer e Reynolds 1996**). É actualmente reconhecido que a densidade da vascularização intratumoral representa um indicador para a emergência e crescimento de lesões malignas e, no caso de tumores sólidos, constitui mesmo um factor de prognóstico independente (**Augustin e col. 1995**).

A endometriose pode considerar-se um modelo fisiopatológico onde a angiogénese desempenha um papel importante, uma vez que o crescimento e proliferação das células endometriais, após a sua implantação inicial no mesotélio, depende da formação de uma rede vascular sublesional capaz de manter o imprescindível aporte sanguíneo (**Donnez e col. 1998; Healy e col. 1998; Witz 1999; McLaren 2000; Fasciani e col. 2000**). O reconhecimento de que o crescimento tecidular acima de um volume de 2 to 3 mm^3 ou de que uma proliferação celular superior a 1×10^6 células requer a formação de novos vasos sanguíneos, sustenta mesmo a hipótese da endometriose ser uma doença angiogénese-dependente (**Folkman 1995; Witz 1999**).

Entre os numerosos factores que têm vindo a ser associados à modulação da angiogénese destaca-se o VEGF por ser o mais potente e o que melhor tem sido estudado (**Phillips e col. 1990; Shweiki e col. 1993; Redmer e Reynolds 1996; Yamamoto e col. 1997; Yan e col. 1998;**

Reynolds e Redmer 1998; Ferrara e col. 1998; Kumar-Singh e col. 1999; Orre e Rogers 1999; McLaren 2000; Xavier 2000). Factor de crescimento com potente acção mitogénica, morfogénica e quimioatractiva sobre as células endoteliais é ainda promotor da permeabilidade vascular (**Dvorak e col. 1995; Ferrara e Davis-Smyth 1997**). Os seus elevados níveis no tecido endometrial ectópico e no líquido peritoneal em mulheres com endometriose sugere um papel importante na fisiopatologia da doença (**Oosterlynck e col. 1993; McLaren e col. 1996; Shifren e col. 1996; Kupker e col. 1998; Donnez e col. 1998; Mahnke e col. 2000; Fasciani e col. 2000; Harada e col. 2001; Wu e Ho 2003**). Já no que diz respeito aos níveis séricos deste factor em doentes com endometriose os resultados publicados são contraditórios (**Pellicer e col. 1998; Fasciani e col. 2001; Matalliotakis e col. 2003; Gagné e col. 2003**).

Outros mediadores evidenciam igualmente uma importante actividade angiogénica, sendo de destacar o TNF-α, a IL8, do FGF-1 e -2 e o TGF (**Mori e col. 1991; Redmer e Reynolds 1996; Ryuto e col. 1996; Reynolds e Redmer 1998; Kumar-Singh e col. 1999; Fasciani e col. 2000; Xavier 2000; Calhaz-Jorge e col. 2003**). Dentro deste grupo o TNF-α merece uma atenção especial. Sendo um produto de secreção dos macrófagos activados e um potente indutor do crescimento de novos vasos sanguíneos (**Mori e col. 1991; Ryuto e col. 1996**), foi observado um aumento dos seus níveis no soro e no líquido peritoneal em doentes com endometriose, facto que sugere fortemente a sua participação na fisiopatologia da doença (**Matalliotakis e col. 1997; Bedaiwy e col. 2002; Vignali e col. 2002; Darai e col. 2003; Steff e col. 2004**). Para além da actividade angiogénica, apresenta importantes propriedades inflamatórias, tendo sido também implicado no processo de adesão das células endometriais ao colagénio, na promoção da sua proliferação, acção aparentemente mediada pela IL8, e no aumento da expressão das metaloproteases da matriz, facilitando desse modo o processo de invasão celular (**Leibovich e col. 1987; Mori e col. 1991; Iwabe e col. 2000; Gazvani e Templeton 2002**). Sendo assim, num modelo de estudo da fisiopatologia da endometriose esta citocina revela-se uma opção de investigação interessante uma vez que parece actuar em diferentes níveis de desenvolvimento das lesões.

Para além de uma disfunção angiogénica existe uma evidência crescente de que as doentes com endometriose poderão apresentar anomalias locais e sistémicas na resposta imunológica (**Viniater e col. 1996**), as quais serão mesmo fundamentais para justificar porque é que só determinadas mulheres desenvolvem a doença (**Braun e Dmowski 1998; Seli e col. 2003**). Em conformidade com esta possibilidade está a observação do aumento do número de macrófagos activados no líquido peritoneal de mulheres com endometriose, sem que isso resulte numa maior eficácia na eliminação dos fragmentos de endométrio ectópico (**Halme e col. 1983;**

Olive e col. 1985; Dunselman e col 1988; Surrey e Halme 1990; Lebovic e col. 2001; Harada e col. 2001). Pelo contrário, verificou-se um crescimento das células endometriais em meio de cultura após a adição de líquido peritoneal obtido de doentes com endometriose (**Surrey e Halme 1990**), efeito provavelmente resultante da concentração aumentada de factores de crescimento e de citocinas, aliado a uma disfunção intrínseca do próprio macrófago na sua actividade fagocítica (**Harada e col. 2001**).

A proteína C-reactiva é uma proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos que apresenta níveis séricos aumentados na generalidade dos processos inflamatórios (**Matarese e col. 2000**). Por este motivo é frequentemente utilizada na prática clínica como marcador sérico de uma inflamação activa (**Matarese e col. 2000**). Atendendo ao facto de que a endometriose é caracterizada por um processo inflamatório pélvico que está na base das duas principais consequências da doença, a dor e a infertilidade (**Seli e col. 2003**), seria de esperar que as mulheres afectadas apresentassem valores séricos aumentados da proteína C-reactiva. No entanto, os dois únicos estudos onde esta hipótese foi investigada não foram capazes de a confirmar (**Abrao e col. 1997; Matarese e col. 2000**).

Se tivermos em consideração o facto da síntese do VEGF ser estimulada por factores de crescimento e citocinas (**Shifren e col. 1996**), sobretudo nas situações de hipóxia (**Ladoux e Frelin 1993**), condições existentes nos processos inflamatórios, poder-se-á esperar uma correlação positiva entre a proteína C-reactiva e este factor de crescimento. O mesmo pressuposto se aplica ao TNF-α dadas as suas propriedades pró-inflamatórias (**Mori e col. 1991**). No entanto, não há dados na literatura que possam sustentar esta hipótese, nomeadamente em doentes com endometriose.

Um outro grupo de moléculas que poderá desempenhar um importante papel na fisiopatologia da endometriose é o das moléculas de adesão. A interacção entre o endométrio regurgitado e o mesotélio peritoneal representa um fenómeno essencial para a ocorrência da implantação (**Spuijbroek e col. 1992; Martelli e col. 1993; Jeziorska e col. 1996; Osteen e col. 1996; van der Linden e col. 1996; Bruner e col. 1997; Kokorine e col. 1997; Witz e col. 1999**), sendo igualmente relevante o papel das moléculas de adesão na modulação da capacidade invasora evidenciada em certas lesões (**Gaetje e col. 1997; Darai e col. 1998; Scotti e col. 2000; Poncelet e col. 2002**).

Dentro do referido grupo a caderina-E tem merecido particular atenção na investigação sobre endometriose. Pertencente à família das caderinas, é uma proteína transmembrana cuja expressão se limita aos tecidos epiteliais (**Shimoyama e col. 1989; Takeichi 1991**), e à qual foi atribuído um papel supressor tumoral no mecanismo da carcinogénese (**Behrens 1995**), estando

a sua expressão diminuída na membrana citoplasmática de diferentes células cancerígenas (**Takeichi 1993**).

O papel da caderina-E na fisiopatologia da endometriose não está clarificado uma vez que existem resultados contraditórios quanto à sua expressão no tecido endometrial eutópico e ectópico (**Gaetje e col. 1997; Beliard e col. 1997; Ota e Tanaka 1997**). Também por esclarecer está o significado dos níveis séricos da sua forma solúvel nas doentes com endometriose. Considerada um produto de degradação da molécula intacta, esta forma solúvel com 80kDa de peso molecular reflecte o ritmo de regeneração tecidular (**Wheelock e col. 1987**). Por esse motivo é encontrada na circulação de indivíduos saudáveis, embora os seus níveis pareçam estar particularmente elevados no caso de neoplasias malignas, podendo mesmo ser utilizada como marcador de invasão (**Katayama e col. 1994; Griffiths e col. 1996; Gofuku e col. 1998; Cioffi e col. 1999; Juhasz e col. 2003; Kuefer e col. 2003**). Não existem, no entanto, dados consistentes na literatura quanto aos valores séricos da caderina-E nas doentes com endometriose. Os resultados dos dois únicos estudos publicados que abordam esta questão são diametralmente opostos (**Jedryka e col. 2001; Fu e Lang 2002**).

Através de determinações seriadas propusemo-nos comparar os níveis séricos do VEGF, do TNF-α, da proteína C-reactiva e da caderina-E ao longo do ciclo menstrual, em mulheres com e sem endometriose. Também foi nosso propósito estudar possíveis associações entre os marcadores séricos com propriedades angiogénicas e inflamatórias (VEGF, TNF-α e proteína C-reactiva). Tivemos igualmente por objectivo estudar nestes dois grupos de mulheres, os níveis plasmáticos dos determinantes antigénicos associados a tumores OC 125 (CA 125) e 1116-NS-19-9 (CA 19-9), na fase proliferativa inicial do ciclo menstrual. Apesar de extensamente estudados, o interesse da utilização destes marcadores no diagnóstico da doença mantém-se questionável (**Koninckx e col. 1992; O'Shaughnessy e col. 1993; Hornstein e col. 1995; Guerriero e col. 1996; Mattliotakis e col. 1998; Mol e col. 1998; Abrao e col. 1999; Harada e col. 2002; Somigliana e col. 2004**).

4.2. População e Métodos

4.2.1. Selecção da população estudada

Foram recrutadas para o estudo um total de 38 mulheres, 25 das quais com suspeita de endometriose e 13 aparentemente saudáveis. Todas elas frequentavam a consulta de Ginecologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de São João e apresentavam idades compreendidas entre os 20 e os 36 anos. Após o recrutamento inicial foram repartidas por dois grupos: grupo com endometriose e grupo de controlo.

Os critérios de selecção utilizados foram semelhantes aos descritos anteriormente (ver capítulo 3, páginas 90 a 92): consideraram-se com endometriose as doentes com pelo menos um endometrioma com diâmetro máximo superior a 3 cm identificado por ultrasonografia transvaginal e ausência de qualquer outra condição médica ou ginecológica associada. Em todos os casos foi possível confirmar o diagnóstico definitivo de endometriose com base na realização de uma laparoscopia e do exame histológico do produto de biópsia da lesão. A coexistência dos endometriomas com lesões peritoneais superficiais foi identificada na totalidade das doentes. A exclusão de lesões profundas infiltrativas associadas foi garantida pelo exame clínico e laparoscópico. A última classificação proposta pela "American Society for Reproductive Medicine" (ASRM) (**American Society for Reproductive Medicine 1997**) foi a utilizada para estadiar a endometriose, tendo-se verificado que todas as doentes se encontravam em fase avançada da doença (estádio III-IV da ASRM).

O grupo de controlo foi constituído por mulheres candidatas à realização de uma laparoscopia para esterilização cirúrgica ou como parte do protocolo de estudo de uma infertilidade conjugal de causa inexplicada. Em todos estes casos o diagnóstico de endometriose foi excluído aquando da realização do exame clínico e laparoscópico.

Para além dos critérios de selecção inicial, foram adoptadas as seguintes condições a aplicar a todas as mulheres participantes: [1] ausência de exposição a qualquer tratamento hormonal nos três meses que antecederam o início do estudo; [2] regularidade dos ciclos menstruais, definida pela presença de interlúnios com duração entre 28 a 30 dias e de cataménios com duração entre dois e cinco dias; [3] confirmação da ovulação e de uma fase

luteínica adequada no ciclo durante o qual se realizou o estudo, pela observação de uma valor de progesterona sérica superior a 8.00 ng/mL entre o 21° e o 23° dia (**Hull e col. 1982; Silva-Carvalho 1995**).

Tal como referido no capítulo anterior todas as participantes no estudo foram devidamente esclarecidas e deram o seu consentimento por escrito, em conformidade com as recomendações da Comissão de Ética do Hospital de São João, à qual o projecto foi submetido.

4.2.2. Desenho do estudo

De cada participante foram colhidas quatro amostras de sangue venoso ao longo de um ciclo menstrual num total de 152 amostras. Todas as colheitas foram realizadas no período da manhã, entre as 8.30 e as 10.00 horas, sem jejum prévio e a intervalos de sete dias, tendo a primeira sido sempre realizada entre o terceiro e o quinto dia do ciclo de forma a garantir uma amostragem regular e sistematizada em cada fase do ciclo de acordo com o seguinte critério:

- Fase proliferativa inicial: dia 1 ao dia 7 do ciclo.
- Fase proliferativa tardia: dia 8 ao dia 14 do ciclo.
- Fase secretora inicial: dia 15 ao dia 21 do ciclo
- Fase secretora tardia: dia 22 ao dia 28-30 do ciclo.

Com a adopção deste desenho pode desde já referir-se que o dia médio de colheita da amostra de sangue em cada fase do ciclo foi similar nos dois grupos (Tabela 4.1.).

O perfil hormonal de cada um dos grupos foi avaliado com base nos doseamentos séricos do estradiol, da progesterona, da hormona folículo-estimulante (FSH) e da hormona luteinizante (LH), em cada uma das quatro fase do ciclo menstrual. Para além deste estudo do perfil hormonal ao longo do ciclo, foi realizada uma colheita adicional de sangue venoso de cada uma das participantes entre o 21° e o 23° dia do ciclo, esta exclusivamente para determinação do nível sérico de progesterona.

O sangue foi colhido para tubos estéreis sem anticoagulante ou contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Após venipunctura as amostras obtidas foram conservadas a 4° C até serem convenientemente tratadas num período máximo de 2

horas após a colheita:

- A partir de tubos sem anticoagulante obteve-se soro, o qual foi dividido em alíquotas e armazenado a -70° C até serem efectuados os doseamentos do estradiol, da progesterona, da FSH, da LH, do VEGF, do TNF-α, da proteína C-reactiva e da forma solúvel da caderina-E nas 152 amostras.

- Os tubos contendo EDTA foram usados para obtenção de plasma. O plasma foi dividido em alíquotas e armazenado a -70° C até serem efectuados os doseamentos do CA 125 e do CA 19-9 nas amostras correspondentes.

4.2.3. Doseamentos sistémicos

Todas as análises e calibrações foram realizadas em duplicado no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pelo mesmo executante (L.B.), excepção feita para as determinações de progesterona sérica entre o 21° e o 23° dia do ciclo que foram realizadas no Laboratório Nobre da Faculdade de Medicina do Porto. Neste último caso as determinações foram realizadas com base num ensaio radioimunoenzimático (RIA) utilizando para tal o "kit" Coat-A-Count Progesterone comercializado pelo fabricante DPC Inc. (Los Angeles, USA) e seguindo as instruções do fabricante.

As determinações séricas do VEGF, do TNF-α e da caderina-E foram realizadas com base num ensaio imunoenzimático (ELISA) e em "kits" comercializados pelo fabricante R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA): DuoSet ELISA Human VEGF165 Development System, Quantikine High Sensitivity Human TNF-α Immunoassay e Quantikine Human sE-Cadherin Immunoassay. Em todos os casos foram seguidas as recomendações do fabricante.

A quantificação dos níveis de proteína C-reactiva foi realizada no soro usando um ensaio imunoenzimático (ELISA) de alta sensibilidade, tal como descrito anteriormente (**Packard e col. 2000**). A placa de ELISA foi revestida com um anticorpo policlonal dirigido contra a proteína C--reactiva humana (Rabbit anti-human CRP, Dako) e incubada (100 μl/poço) com este anticorpo, diluído a uma concentração proteica de 10 μg/ml em tampão de revestimento (tampão fosfato 0,01 M, NaCl 0,145 M; pH 7,2), por um período de pelo menos 24 horas a 4° C. A placa foi

lavada com um tampão [tampão fosfato 0,01 M, NaCl 0,5 M, Tween 20 0,1% (w/v); pH 7,2] por três vezes, com um intervalo de 3 min entre cada lavagem. Foram aplicados em duplicado 100 µl de amostra (diluída 1:100 em tampão de lavagem) e 100 µl de padrões (Human Serum CRP Calibrator, Dako) nas seguintes concentrações: 0,1070, 0,0535, 0,0214, 0,0107, 0,0054 e 0,0011 mg/l (diluições feitas em tampão de lavagem) e seguiu-se uma incubação por 24 horas a 4° C. A placa foi lavada por três vezes e incubada com 100 µl do segundo anticorpo diluído a 1:3.000 em tampão de lavagem (Peroxidase-conjugated rabbit anti-human CRP, Dako). Após uma incubação de 60 min à temperatura ambiente, a lavagem foi repetida tal como anteriormente.

A revelação foi efectuada por reacção com solução de o-fenilenediamina (OPD tablets, 2 mg, for ELISA, Dako) na presença de H_2O_2 (100 µl/por poço). A reacção enzimática desenvolveu-se por um período de 15 min ao abrigo da luz e foi parada pela adição de H_2SO_4 0.5 M (100µl/poço).

A cor desenvolvida foi quantificada espectrofotometricamente num leitor de placas (MRX, Dynatech) a 490 nm com correcção a 620 nm. Foi elaborado um gráfico de absorvência (no eixo das ordenadas) em função das concentrações de padrão da proteína C-reactiva, usando uma escala Log/Log. Os resultados foram calculados através do uso de uma equação do tipo $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$ e tendo em consideração a diluição da amostra.

A quantificação sérica do estradiol, da progesterona, da FSH, da LH, bem como a quantificação no plasma do CA 125 e do CA 19-9, foi realizada através de testes quantitativos automatizados (Vitek Systems Mini VIDAS, Biomérieux, Durham, USA) usando "kits" comerciais (VIDAS FSH, VIDAS LH, VIDAS Progesterone, VIDAS Estradiol II, VIDAS CA 125 II e VIDAS CA 19-9, respectivamente). O princípio dos doseamentos associa o método imunoenzimático (sandwich ou por competição) a uma detecção final em fluorescência (ELFA).

4.2.4. Análise estatística

As concentrações séricas de cada parâmetro foram comparadas entre os casos e os controlos utilizando para tal o teste de Kruskal-Wallis, ao passo que a comparação destes parâmetros em diferentes fases do ciclo menstrual foi analisada com base no teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas. Os resultados relativos ao dia do ciclo em que se realizou a colheita de sangue, à idade e ao índice de massa corporal das participantes no estudo estão

expressos em média ± desvio padrão. Os resultados das concentrações séricas e plasmáticas de cada parâmetro encontram-se expressos em mediana e intervalo interquartis (percentis 25% e 75%). Os coeficientes de correlação de Pearson foram utilizados (após transformação logarítmica) para quantificar a associação entre parâmetros em estudo em cada fase do ciclo, tanto no grupo de casos como no grupo de controlo. Considerou-se como estatisticamente significativo um valor de $P < 0.05$.

Utilizámos as curvas ROC ("receiver operating characteristic") para avaliar a sensibilidade e a especificidade do CA 125 e CA 19-9 na detecção de endometriose. A curva ROC ideal corresponde a um teste que discrimina entre duas populações na perfeição, coincidindo com o limite esquerdo e superior do gráfico (Figura 4.2). A validade de um teste é quantificável pela "área abaixo da curva ROC". Uma curva ROC para um determinado teste que seja representada por uma linha recta que une o canto inferior esquerdo ao superior direito do gráfico significa que esse teste não tem qualquer capacidade discriminativa. Esta área foi calculada para o CA 125 e CA 19-9 com intervalos de confiança de 95%, e foram definidos como pontos de corte para estes dois marcadores os valores que permitiam a correcta classificação do maior número de participantes.

4.3. Resultados

Tal como referido anteriormente, com o esquema ensaiado o dia médio de obtenção da amostra de sangue em cada fase do ciclo foi similar nos dois grupos (Tabela 4.1).

Fase do ciclo	Endometriose	Controlo	P
Proliferativa inicial	4.1 ± 1.8	4.3 ± 2.0	0.667
Proliferativa tardia	11.0 ± 1.9	11.3 ± 2.3	0.638
Secretora inicial	18.2 ± 2.0	18.3 ± 2.3	0.844
Secretora tardia	25.2 ± 2.6	25.8 ± 2.9	0.557

Tabela 4.1: Dia da colheita de sangue venoso (média ± desvio padrão) para estudo dos marcadores séricos em cada um dos grupos e para cada fase do ciclo.

4.3.1. Estradiol, Progesterona, FSH e LH

Neste estudo foram realizados doseamentos do estradiol, progesterona, FSH e LH para aferição do perfil hormonal de cada um dos grupos. Apresentam-se a seguir as medianas das concentrações séricas observadas para cada uma dessas hormonas nos dois grupos de participantes ao longo das quatro fases do ciclo menstrual (Tabelas 4.2 a 4.5).

Os resultados dos doseamentos hormonais realizados no nosso estudo demonstraram não existir diferenças com significado estatístico entre os dois grupos para qualquer uma das hormonas em cada uma das fases do ciclo, ou seja, ambos apresentavam um perfil hormonal semelhante.

Estradiol (pg/mL) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	48.6 (40.1 - 65.8)	46.5 (38.7 - 51.6)	0.538
Proliferativa tardia	110.1 (94.6 - 203.8)	130.9 (80.0 - 201.2)	0.770
Secretora inicial	137.1 (86.9 - 206.3)	153.3 (86.8 - 170.4)	0.939
Secretora tardia	115.0 (83.2 - 211.1)	115.5 (77.3 - 134.0)	0.288

Tabela 4.2: Valores séricos do estradiol (pg/mL) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo.

Progesterona (ng/mL) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	0.8 (0.7 - 1.1)	0.7 (0.5 - 1.1)	0.261
Proliferativa tardia	0.9 (0.7 - 1.1)	0.7 (0.5 - 1.1)	0.218
Secretora inicial	9.4 (3.0 - 13.9)	5.9 (1.0 - 22.7)	0.939
Secretora tardia	9.8 (3.8 - 15.8)	10.2 (1.0 - 17.7)	0.747

Tabela 4.3: Valores séricos da progesterona (ng/mL) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo.

FSH (mUI/mL) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	5.7 (4.9 - 7.5)	5.9 (4.5 - 6.8)	0.842
Proliferativa tardia	5.0 (3.8 - 6.8)	4.3 (3.8 - 5.7)	0.424
Secretora inicial	4.2 (3.2 - 5.0)	4.0 (2.9 - 5.8)	0.747
Secretora tardia	3.7 (2.5 - 4.6)	3.3 (2.5 - 3.8)	0.406

Tabela 4.4: Valores séricos da FSH (mUI/mL) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo.

LH (mUI/mL) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	3.6 (2.4 - 4.6)	2.6 (2.0 - 3.1)	0.061
Proliferativa tardia	6.7 (4.5 - 8.0)	5.4 (3.4 - 8.1)	0.540
Secretora inicial	5.3 (4.1 - 6.5)	4.1 (3.1 - 6.0)	0.262
Secretora tardia	3.2 (2.2 - 5.0)	1.8 (1.4 - 3.3)	0.079

Tabela 4.5: Valores séricos da LH (mUI/mL) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo.

Como pode observar-se na tabela 4.6 foi possível documentar em todas as participantes a ocorrência de ovulação e de uma fase luteínica adequada no ciclo durante o qual se realizou o estudo, uma vez que todas elas apresentaram um valor de progesterona sérica superior a 8.00 ng/mL entre o 21º e o 23º dia.

Endometriose		Controlo	
	Progesterona (ng/mL)		Progesterona (ng/mL)
Caso 1	12,58	Controlo 1	12,23
Caso 2	13,12	Controlo 2	24,54
Caso 3	15,45	Controlo 3	19,98
Caso 4	9,12	Controlo 4	26,77
Caso 5	22,30	Controlo 5	21,98
Caso 6	21,65	Controlo 6	11,04
Caso 7	14,98	Controlo 7	13,23
Caso 8	16,30	Controlo 8	9,89
Caso 9	13,90	Controlo 9	25,10
Caso 10	11,13	Controlo 10	23,20
Caso 11	14,68	Controlo 11	12,67
Caso 12	11,32	Controlo 12	9,23
Caso 13	10,02	Controlo 13	11,67
Caso 14	12,50		
Caso 15	12,43		
Caso 16	23,10		
Caso 17	18,56		
Caso 18	17,12		
Caso 19	17,34		
Caso 20	10,99		
Caso 21	18,34		
Caso 22	13,77		
Caso 23	19,23		
Caso 24	15,10		
Caso 25	16,25		

Tabela 4.6: Nível sérico de progesterona (ng/mL) observada em cada uma das participantes entre o 21º e o 23º dia do ciclo.

4.3.2. VEGF, TNF-α e Proteína C-reactiva

Analisando a mediana da concentração sérica do VEGF (pg/mL) nas quatro fases do ciclo em cada um dos grupos verifica-se que as mulheres com endometriose apresentam valores significativamente mais elevados na fase secretora inicial e tardia (Tabela 4.7). Uma grande sobreposição de valores foi, no entanto, registada entre as mulheres com e sem endometriose. Dentro de cada um dos grupos não se encontraram variações com significado estatístico nas concentrações séricas do VEGF ao longo das diferentes fases do ciclo (P > 0.1 para cada uma das comparações).

VEGF (pg/mL) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	**227** (162 - 408)	**210** (93 - 250)	**0.070**
Proliferativa tardia	**219** (171 - 430)	**191** (100 - 263)	**0.056**
Secretora inicial	**238** (160 - 396)	**189** (110 - 221)	**0.034**
Secretora tardia	**261** (173 - 404)	**199** (99 - 246)	**0.019**

Tabela 4.7: Valores séricos do VEGF (pg/mL) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo.

Na tabela 4.8 pode observar-se que as mulheres com endometriose apresentam valores da concentração sérica do TNF-α (pg/mL) significativamente mais elevados em todas as fases do ciclo menstrual. Tal como havíamos observado para o VEGF também encontramos uma grande sobreposição de valores do TNF-α entre as mulheres com e sem endometriose. Ao longo do ciclo os valores mantiveram-se bastante estáveis dentro de cada um dos grupos, não tendo sido observadas diferenças com significado estatístico entre as quatro fases (P > 0.1 para cada uma das comparações).

TNF - α (pg/mL) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	**2.02** (1.48 - 3.67)	**1.34** (1.20 - 1.79)	**0.035**
Proliferativa tardia	**1.92** (1.49 - 3.07)	**1.17** (1.03 - 1.99)	**0.044**
Secretora inicial	**1.89** (1.41 - 2.98)	**1.31** (0.97 - 1.89)	**0.035**
Secretora tardia	**2.23** (1.29 - 3.64)	**1.28** (0.83 - 2.14)	**0.024**

Tabela 4.8: Valores séricos do TNF-α (ng/mL) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo.

No que diz respeito às medianas das concentrações séricas da proteína C-reactiva (mg/L) não foram detectadas diferenças com significado estatístico entre os dois grupos e para cada uma das fases do ciclo (Tabela 4.9).

PCR (mg/L) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	**2.29** (0.70 - 3.54)	**0.68** (0.19 - 2.22)	**0.077**
Proliferativa tardia	**1.10** (0.30 - 2.06)	**0.59** (0.21 - 1.28)	**0.415**
Secretora inicial	**1.09** (0.39 - 2.62)	**0.90** (0.42 - 2.31)	**0.794**
Secretora tardia	**0.60** (0.28 - 3.19)	**0.87** (0.22 - 1.52)	**0.770**

Tabela 4.9: Valores séricos da proteína C-reactiva (mg/L) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo. PCR= proteína C-reactiva.

Também para este marcador notámos uma grande sobreposição de valores entre mulheres com e sem endometriose. A estabilidade de valores ao longo do ciclo dentro de cada um dos grupos foi uma vez mais evidente, uma vez que não foram encontradas diferenças com significado estatístico quando as quatro fases foram comparadas entre si ($P > 0.1$ para cada uma das comparações).

A análise das associações entre estes três marcadores séricos (VEGF, TNF-α e proteína C-reactiva) permitiu detectar uma correlação positiva entre a proteína C-reactiva, o VEGF e a endometriose em todas as fases do ciclo excepto na secretora inicial (Tabela 4.10 e Figura 4.1). Uma vez que este achado não foi observado no grupo de mulheres sem endometriose poderá conferir-lhe alguma especificidade como marcador.

Fase do Ciclo	ln VEGF / ln PCR	ln TNF-α / ln PCR	ln VEGF / ln TNF-α
Proliferativa inicial			
Endometriose (n=25)	r =0.56; P =0.004	r =0.27; P =0.18	r =0.07; P =0.76
Controlos (n=13)	r =0.12; P =0.70	r =0.47; P =0.11	r =0.21; P =0.49
Proliferativa tardia			
Endometriose (n=25)	r =0.46; P =0.02	r =0.09; P =0.66	r = -0.02; P =0.91
Controlos (n=13)	r =0.003; P =0.99	r =0.37; P =0.22	r =0.20; P =0.50
Secretora inicial			
Endometriose (n=25)	r =0.32; P =0.11	r =0.15; P =0.46	r =0.03; P =0.88
Controlos (n=13)	r = -0.19; P =0.53	r =0.24; P =0.42	r =0.50; P =0.08
Secretora tardia			
Endometriose (n=25)	r =0.54; P =0.006	r =0.17; P =0.41	r =0.01; P =0.95
Controlos (n=13)	r =0.06; P =0.85	r =0.53; P =0.06	r =0.01; P =0.97

Tabela 4.10: Coeficientes de correlação de Pearson (após transformação logarítmica) para quantificar a associação entre os três marcadores séricos em estudo em cada fase do ciclo. PCR = proteína C-reactiva.

Não foi possível estabelecer qualquer correlação com significado estatístico em relação às associações proteína C-reactiva / TNF-α e VEGF / TNF-α (Tabela 4.10)

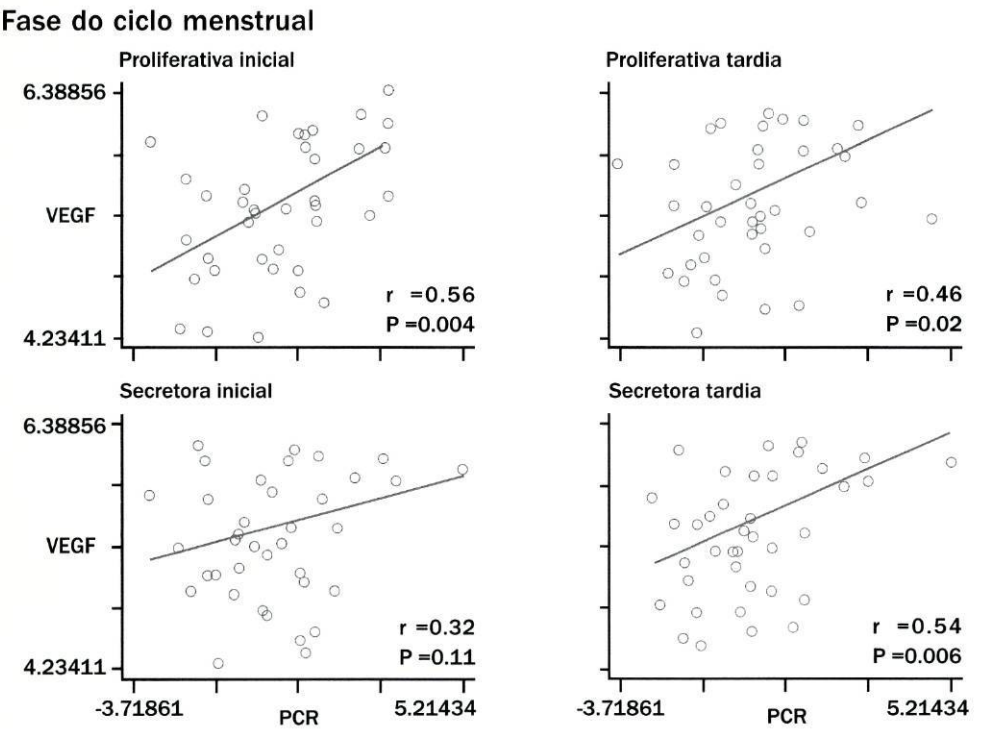


Figura 4.1: Correlação entre o VEGF e a proteína C-reactiva (PCR) sérica no grupo de mulheres com endometriose nas quatro fases do ciclo menstrual. Apenas na fase secretora inicial a correlação positiva observada não teve significado estatístico.

4.3.3. Caderina-E

As mulheres com endometriose apresentaram concentrações séricas da caderina-E (ng/mL) significativamente mais baixas em todas as fases do ciclo menstrual, mas a sobreposição de valores entre mulheres com e sem endometriose foi bastante evidente em qualquer uma das fases (Tabela 4.11). Também para esta molécula não foram encontradas diferenças com significado estatístico quando as quatro fases foram comparadas entre si dentro de cada um dos grupos ($P > 0.1$ para cada uma das comparações).

Caderina-E (ng/mL) Fase do Ciclo	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
Proliferativa inicial	**36.49** (31.98 - 41.87)	**45.60** (42.81 - 46.78)	**0.005**
Proliferativa tardia	**37.50** (33.74 - 41.52)	**42.96** (41.48 - 46.51)	**0.008**
Secretora inicial	**37.33** (34.82 - 42.57)	**43.80** (42.26 - 48.49)	**0.010**
Secretora tardia	**38.16** (34.47 - 42.83)	**46.05** (44.57 - 47.38)	**0.005**

Tabela 4.11: Valores séricos da forma solúvel de Caderina-E (ng/mL) [mediana (intervalo interquartis)] ao longo do ciclo menstrual nos dois grupos em estudo.

4.3.4. CA 125 e CA 19-9

Os marcadores tumorais CA 125 e CA 19-9 foram doseados no plasma apenas na fase proliferativa inicial do ciclo menstrual. Na tabela 4.12 encontram-se discriminados os resultados dos doseamentos destes dois marcadores em cada uma das mulheres participantes do estudo. No caso 23 observou-se um resultado inesperadamente alto do CA 125 (600.00 UI/mL) e menos pronunciado do CA 19-9 (92.89 UI/mL), mas a intervenção cirúrgica permitiu excluir a hipótese desse aumento ser secundário a qualquer lesão maligna. O número 12 do grupo de controlo refere-se a uma mulher aparentemente saudável referenciada para esterilização cirúrgica mas que apresentou valores consideravelmente aumentados do CA 125 (111.37 UI/mL). Também neste caso a hipótese de endometriose ou de qualquer outra entidade ginecológica que pudesse resultar num aumento plasmático do CA 125 foi excluída através da laparoscopia. Também a probabilidade de adenomiose foi minimizada tendo por base critérios ultrasonográficos previamente descritos (**Bazot e col. 2001**).

Tal como esperado, as mulheres com endometriose apresentaram concentrações plasmáticas do CA 125 significativamente mais elevados (Tabela 4.13). No que diz respeito ao CA 19-9 as diferenças observadas ficaram próximas da significância com valores mais elevados no grupo de doentes (Tabela 4.13).

Endometriose			Controlos		
	CA 125 (UI/mL)	CA 19-9 (UI/mL)		CA 125 (UI/mL)	CA 19-9 (UI/ML)
Caso 1	65,61	23,23	Controlo 1	12,14	3,00
Caso 2	22,58	7,29	Controlo 2	20,87	5,17
Caso 3	23,00	6,82	Controlo 3	12,05	13,80
Caso 4	37,79	9,23	Controlo 4	18,44	7,70
Caso 5	8,51	3,00	Controlo 5	6,43	5,23
Caso 6	71,60	3,00	Controlo 6	8,11	3,00
Caso 7	33,03	26,50	Controlo 7	6,57	3,00
Caso 8	36,35	3,00	Controlo 8	10,60	3,00
Caso 9	38,37	13,16	Controlo 9	7,94	6,95
Caso 10	11,16	7,82	Controlo 10	17,86	21,95
Caso 11	41,42	23,59	Controlo 11	9,72	9,56
Caso 12	83,70	3,00	Controlo 12	111,37	3,65
Caso 13	32,88	10,81	Controlo 13	17,86	6,71
Caso 14	60,69	8,82			
Caso 15	7,95	4,40			
Caso 16	112,42	38,33			
Caso 17	52,26	5,70			
Caso 18	9,31	12,47			
Caso 19	18,32	6,29			
Caso 20	15,22	7,00			
Caso 21	9,17	12,35			
Caso 22	22,88	25,69			
Caso 23	600,00	92,89			
Caso 24	57,96	13,92			
Caso 25	23,15	5,35			

Tabela 4.12: Valores plasmáticos do CA 125 e CA 19-9 em amostras de sangue obtidas na fase proliferativa inicial do ciclo de cada uma das mulheres participantes.

Marcadores Tumorais	Endometriose (n = 25)	Controlo (n = 13)	P
CA 125 (UI/mL)	**33.03** (18.32 - 57.96)	**12.05** (8.11 - 17.86)	**0.004**
CA 19-9 (UI/mL)	**8.82** (5.70 - 13.92)	**5.23** (3.00 - 7.70)	**0.058**

Tabela 4.13: Valores plasmáticos do CA 125 e do CA 19-9 (UI/mL) [mediana (intervalo interquartis)] em mulheres com e sem endometriose na fase proliferativa inicial do ciclo.

Com base nos resultados obtidos calculámos a sensibilidade, especificidade, valor predictivo positivo e negativo para cada um dos marcadores tumorais, tendo em conta um valor de referência de 35.00 UI/mL para o CA 125 e de 37.00 UI/mL para o CA 19-9, considerados valores padrão de referência pela generalidade dos autores **(Mol e col. 1998; Harada e col. 2002; Somigliana e col. 2004)** (Tabela 4.14).

Valor do Teste	CA 125 (v.r.= 35.00 UI/mL)	CA 19-9 (v.r.= 37.00 UI/mL)	Um e outro positivos	Um ou outro positivos
Sensibilidade	**48.0%**	**8.0%**	**8.0%**	**48.0%**
Especificidade	**92.3%**	**100%**	**100%**	**92.3%**
Valor predictivo positivo	**92.3%**	**100%**	**100%**	**92.3%**
Valor predictivo negativo	**48.0%**	**36.1%**	**36.1%**	**48.0%**

Tabela 4.14: Sensibilidade, especificidade, valor predictivo positivo e negativo das concentrações plasmáticas do CA 125 e CA 19-9 quando foram adoptados os valores de referência de 35.00 e 37.00 UI/mL, respectivamente. Nota: v.r. = valor de referência.

Dessa análise pudemos observar que qualquer um dos marcadores tumorais em questão apresentou alta especificidade e alto valor predictivo positivo mas baixa sensibilidade e baixo valor predictivo negativo. A associação dos dois marcadores não permitiu melhorar o valor do teste.

As curvas ROC (calculadas a partir dos nosso resultados) para avaliação da sensibilidade e especificidade dos níveis plasmáticos destes dois marcadores tumorais na detecção de endometriose estão consideradas na figura 4.2.

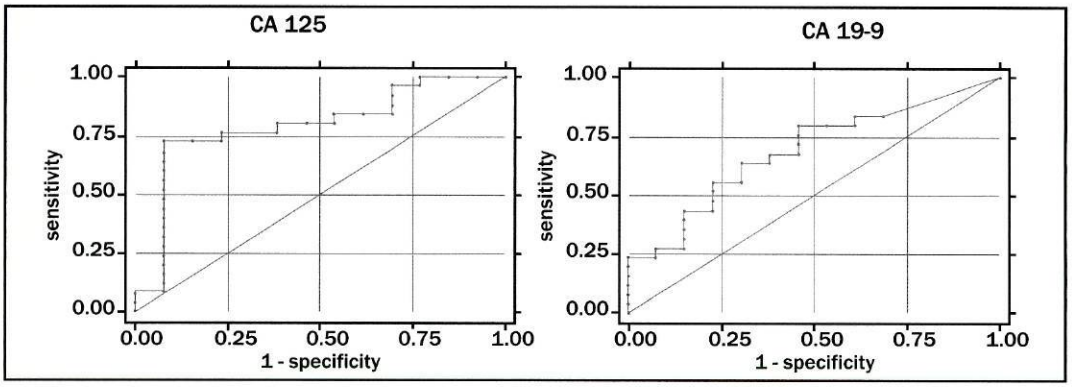


Figura 4.2: Curvas ROC para identificação de endometriose para o CA 125 e CA 19-9.

Na tabela 4.15 estão expressas as "áreas abaixo das curvas ROC", os intervalos de confiança de 95% e o melhor valor de referência obtido para cada um dos marcadores tumorais, definido como o valor que classifica correctamente o maior número de participantes.

Marcadores Tumorais	Área abaixo da curva ROC	Intervalos de confiança de 95%		Melhor valor de referência
		limite inferior	limite superior	
CA 125	0.791	0.628	0.954	**22.58**
CA 19-9	0.689	0.514	0.865	**5.35**

Tabela 4.15: Áreas abaixo das curvas ROC, com intervalos de confiança de 95%, para cada um dos marcadores tumorais estudados na identificação de endometriose. O melhor valor de referência é o valor que apresenta melhor sensibilidade e especificidade.

Na tabela 4.16 estão expressos os resultados da sensibilidade, especificidade, valor predictivo positivo e negativo dos níveis plasmáticos do CA 125 e CA 19-9 e respectivas associações na identificação da endometriose, tendo por base a adopção dos valores de referência calculados a partir das curvas ROC, respectivamente de 22.58 UI/mL para o CA 125 e 5.35 UI/mL para o CA 19-9.

Valor do Teste	CA 125 (v.r.= 22.58 UI/mL)	CA 19-9 (v.r.= 5.35 UI/mL)	Um e outro positivos	Um ou outro positivos
Sensibilidade	72.0%	80.0%	60.0%	92.0%
Especificidade	92.3%	53.9%	100%	46.1%
Valor predictivo positivo	94.7%	76.9%	100%	76.7%
Valor predictivo negativo	63.2%	58.3%	56.5%	75.0%

Tabela 4.16: Sensibilidade, especificidade, valor predictivo positivo e negativo das concentrações plasmáticas do CA 125 e CA 19-9 quando foram adoptados os valores de referência calculados com base nas curvas ROC de 22.58 e 5.35 UI/mL, respectivamente.
Nota: v.r. = valor de referência.

De salientar que no caso do CA 125, a utilização do valor de 22.58 UI/mL em alternativa ao valor de 35.00 UI/mL, habitualmente recomendado na literatura, permitiu uma melhoria significativa da sensibilidade (72.0% versus 48.0%) e do valor predictivo negativo (63.2% versus 48.0%), sem qualquer alteração na especificidade (92.3%) e até melhorando ligeiramente o valor predictivo positivo (94.7% versus 92.3%). No caso do CA 19-9 a utilização do valor de referência por nós calculado permitiu uma melhoria significativa da sensibilidade (80.0% versus 8.0%) e do valor predictivo negativo (58.3% versus 36.1%), embora aqui à custa de um agravamento da especificidade (53.9% versus 100%) e do valor predictivo positivo (76.9% versus 100%).

Desta análise salientámos igualmente os resultados relativos ao valor do teste quando foi utilizada a associação dos dois marcadores e dos valores de referência por nós calculados. Se com a condição de ambos os testes serem positivos observámos um aumento significativo da sensibilidade (60.0% versus 8.0%) e do valor predictivo negativo (56.5% versus 36.1%), mantendo a especificidade e o valor predictivo positivo nos 100%, com a condição de bastar um deles ser positivo observámos uma melhoria da sensibilidade (92.0% versus 48.0%) e do valor predictivo negativo (75.0% versus 48.0%), embora neste caso à custa de um agravamento da especificidade (46.1% versus 92.3%) e do valor predictivo positivo (76.7% versus 92.3%).

Não encontramos diferenças com significado estatístico entre as mulheres com e sem endometriose quando comparadas para a idade (20-36; 25-35 anos) ou para o índice de massa corporal (18.1-25.0; 19.6-30.5 Kg/m2) (Tabela 4.17).

	Endometriose (n=25)	Controlo (n=13)	P
Idade (anos)	28.84 ± 4.0	30.84 ± 4.8	0.329
IMC (Kg/m2)	21.82 ± 3.1	23.89 ± 3.7	0.111

Tabela 4.17: Idade e índice de massa corporal (IMC) das populações de mulheres estudadas. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

4.4. Discussão

A necessidade de clarificar a fisiopatologia da endometriose esteve presente na nossa mente quando nos propusemos estudar, no meio circulatório sistémico de mulheres com e sem a doença, factores biomoleculares com propriedades angiogénicas, inflamatórias e de adesividade celular, mecanismos que têm sido associados à patogénese desta entidade. A identificação de marcadores séricos ou plasmáticos, susceptíveis de tornar mais eficazes os métodos de detecção da doença foi também determinante para o delinear deste estudo.

Considerámos relevante o achado de valores séricos do VEGF significativamente aumentados nas fases secretora inicial e tardia do ciclo menstrual em mulheres com endometriose, e de valores significativamente mais elevados do TNF-α ao longo de todo o ciclo. Observámos também uma correlação positiva entre a proteína C-reactiva e o VEGF nas mulheres com endometriose em todas as fases do ciclo, excepto na fase secretora inicial. Relativamente à caderina-E, a diminuição significativa desta molécula de adesão nas mulheres com endometriose em todas as fases do ciclo constituiu um achado particularmente interessante como veremos adiante. Se o aumento do CA 125 nas doentes constituiu uma observação já por nós esperada, a demonstração de uma maior eficácia dos marcadores tumorais CA 125 e CA 19-9 na detecção da endometriose quando utilizados em associação e adoptando valores de referência mais baixos do que os habitualmente recomendados na literatura, representa uma contribuição especialmente importante, uma vez que pode resultar em estratégias diagnósticas mais eficazes.

Tal como já o havíamos feito na discussão dos resultados da investigação ultrasonográfica (ver capítulo 3, página 101), as limitações metodológicas deste tipo de estudo (**Zondervan e col. 2002; Missmer e Cramer 2003**) merecem ser de novo comentadas. A dificuldade na correcta selecção dos casos de endometriose levou-nos a incluir no grupo de doentes apenas casos com lesões activas (**Audebert e col. 1992; Missmer e Cramer 2003**), representadas no nosso estudo pela identificação ultrasonográfica de pelo menos um endometrioma com um diâmetro máximo igual ou superior a 3 cm, diagnóstico confirmado por laparoscopia. Segundo os critérios da última classificação da "American Society for Reproductive Medicine" (ASRM) (**American Society for Reproductive Medicine 1997**), a presença de um endometrioma com um diâmetro máximo superior a 3 cm é suficiente para classificar a doente em estádio III. Com base nessa classificação constatámos que todos os nossos casos se encontravam em fase avançada da doença (estádio III-IV da ASRM). Em todas as doentes os endometriomas coexistiam com lesões de endometriose peritoneal superficial. Dessa forma, os resultados por nós observados só podem ser extrapolados para este subgrupo de doentes, uma vez que o exame clínico e laparoscópico permitiu excluir a terceira forma de apresentação da doença, ou seja a endometriose profunda infiltrativa.

Tendo por base a angiogénese e as alterações inflamatórias como importantes mecanismos na fisiopatologia da endometriose (**Viniater e col. 1996; Healy e col. 1998**), decidimos determinar os valores séricos de um factor de crescimento (VEGF) com reconhecidas propriedades angiogénicas (**Dvorak e col. 1995; Ferrara e Davis-Smyth 1997**) e de uma citocina (TNF-α) com propriedades angiogénicas, inflamatórias, de regulação da população e da adesão celular (**Leibovich e col. 1987; Mori e col. 1991; Ryuto e col. 1996; Iwabe e col. 2000; Gazvani e Templeton 2002**), em mulheres com e sem endometriose ao longo do ciclo menstrual. Propusemo-nos também determinar os valores séricos de uma proteína de fase aguda (proteína C-reactiva), cujos valores se encontram aumentados na generalidade dos processos inflamatórios (**Matarese e col. 2000**).

O VEGF tem sido apontado como exercendo um papel relevante na fisiopatologia da endometriose em função da observação do aumento dos seus níveis nas lesões, no líquido peritoneal e no endométrio eutópico de doentes (**Oosterlynck e col. 1993; McLaren e col. 1996; Shifren e col. 1996; Kupker e col. 1998; Donnez e col. 1998; Mahnke e col. 2000; Fasciani e col. 2000; Harada e col. 2001; Wu e Ho 2003**). **Fasciani e col. (2000)** observaram um aumento significativo do nível do VEGF no interior dos endometriomas quando comparado com o verificado em cistos foliculares. Mas o aumento deste factor no líquido peritoneal de doentes, produzido pelos fragmentos de tecido endometrial e pelos macrófagos peritoneais, foi também descrito

e sugere uma participação deste factor no desenvolvimento da doença (**Oosterlynck e col. 1993; McLaren e col. 1996; Shifren e col. 1996; Kupker e col. 1998; Mahnke e col. 2000; Wu e Ho 2003**). Por outro lado, a observação de uma maior expressão imuno-histoquímica do VEGF no endométrio eutópico de doentes com endometriose relativamente a mulheres saudáveis, não só sugere uma participação deste factor, como estabelece a hipótese do desenvolvimento inicial da endometriose ser sustentado numa disfunção endometrial angiogénica (**Donnez e col. 1998**).

Apesar de todas estas evidências em favor da participação do VEGF na fisiopatologia da endometriose, resultados contraditórios têm sido publicados relativamente aos valores séricos deste factor em mulheres doentes (**Pellicer e col. 1998; Fasciani e col. 2001; Matalliotakis e col. 2003; Gagné e col. 2003**). **Pellicer e col. (1998)** publicaram o primeiro estudo onde os níveis séricos do VEGF foram comparados em mulheres com (n=8) e sem (n=7) endometriose. Notaram uma tendência para valores mais elevados nas doentes, sem contudo atingir o significado estatístico, mas reconheceram que a pequena amostragem do estudo originava óbvias limitações de interpretação (**Pellicer e col. 1998**). Três anos volvidos é publicado novo estudo onde os valores séricos do VEGF de 38 doentes com endometriose ovárica são comparados com os de 53 controlos (43 mulheres com cistos serosos do ovário e 10 com cistos foliculares), tendo sido observado um aumento desses valores nas mulheres com endometriose (**Fasciani e col. 2001**). Em 2003 surgem duas publicações versando o mesmo assunto mas com resultados diametralmente opostos. **Matalliotakis e col. (2003)** notaram um aumento significativo do VEGF sérico em 28 doentes com endometriose, independentemente do estádio da doença, comparativamente com os valores em 20 controlos. Em contrapartida, no estudo mais extenso publicado até à data, os valores séricos do VEGF de 131 doentes foram comparados com os de 146 controlos, não tendo sido encontradas diferenças significativas (**Gagné e col. 2003**). No nosso estudo a observação de um aumento significativo do VEGF sérico nas doentes com endometriose durante a fase secretora inicial e tardia sugere fortemente uma participação deste factor angiogénico na fisiopatologia da endometriose.

O nosso estudo foi o primeiro a avaliar as concentrações séricas do VEGF seriadamente ao longo do ciclo menstrual em doentes com endometriose. Considerámos importante a adopção dessa metodologia uma vez que, apesar de diferentes órgãos (fígado, pulmão ou mama) expressarem o ARNm do VEGF, não se demonstrou que esses tecidos contribuam representativamente para os níveis séricos deste factor (**Ferrara e Davis-Smyth 1997**), contrariamente ao que parece acontecer com a sua produção ao nível do ovário ou das células epiteliais e do estroma endometrial, cuja contribuição para a sua concentração sérica foi já demonstrada (**Bausero e col. 1998**). Tendo em conta o padrão cíclico da actividade angiogénica destes dois órgãos, esperar-se-ia encontrar variações do VEGF sérico ao longo do ciclo (**Agrawal**

e col. 1999; Vasconcelos e col. 2000; Xavier 2000; Meduri e col. 2000; Malamitsi-Puchner e col. 2004; Xavier e col. 2004). A existência dessa ciclicidade em mulheres saudáveis foi descrita em dois estudos, com um aumento observado na fase peri-ovulatória e secretora (**Agrawal e col. 1999; Malamitsi-Puchner e col. 2004**), mas não foi confirmada num terceiro (**Unkila-Kallio e col. 2000**). Apesar de não termos controlado directamente o ciclo menstrual em função do dia da ovulação, observámos uma grande estabilidade nos níveis séricos do VEGF ao longo das quatro fases, quer no grupo das doentes quer no de controlo. Esta nossa observação permite afirmar que, embora aumentos pontuais deste factor possam ocorrer durante um ciclo menstrual, nomeadamente na fase peri-ovulatória, não são de esperar variações significativas entre as diferentes fases do ciclo, ao contrário do que acontece com a actividade angiogénica do ovário e do endométrio. Desse modo, é lícito concluir que existe uma produção aumentada deste factor nas doentes com endometriose, mas a suas concentrações séricas não reflectem a mais que provável produção cíclica local no ovário e no endométrio. Infelizmente, o achado de uma grande sobreposição de valores entre os dois grupos confirma observações anteriores (**Xavier e col. 2002**), ao mesmo tempo que exclui a possibilidade de utilização deste marcador para discriminar entre mulheres com e sem endometriose.

Tal como para o VEGF, a principal evidência quanto ao envolvimento do TNF-α na fisiopatologia da endometriose resulta da observação de níveis elevados no líquido peritoneal de mulheres afectadas pela doença (**Mori e col. 1991; Taketani e col. 1992; Overton e col. 1996; Rana e col. 1996; Vignali e col. 2002; Bedaiwy e col. 2002**), observação todavia não confirmada por todos os autores (**Vercellini e col. 1993; Harada e col. 1997**). Contrariamente à falta de consenso que existe para o VEGF, os resultados apontam com alguma consistência para um aumento dos níveis séricos do TNF-α nas doentes com endometriose (**Matalliotakis e col. 1997; Bedaiwy e col. 2002; Darai e col. 2003; Steff e col. 2004**). **Bedaiwy e col. (2002)** observaram um aumento significativo num grupo de 21 mulheres com endometriose, mesmo quando comparadas com 29 controlos onde se incluíam sete com infertilidade idiopática. Quando confrontadas com as restantes mulheres do grupo de controlo, as mulheres com infertilidade idiopática não apresentavam valores séricos de TNF-α mais elevados, o que sugere uma ausência de associação entre o aumento sérico desta citocina e a infertilidade (**Bedaiwy e col. 2002**). Mais convincente na exclusão desta associação foi a observação de valores séricos de TNF-α similares em mulheres saudáveis (n=16) e mulheres com infertilidade (n=89) (**Naz e col. 1995**).

Os resultados por nós observados de um aumento significativo das concentrações séricas do TNF-α nas doentes com endometriose estão em concordância com o envolvimento

deste factor na fisiopatologia desta doença. Mais uma vez, o nosso estudo foi o único onde os níveis séricos desta citocina foram determinados seriadamente ao longo do ciclo sem contudo ter sido notada qualquer variação em ambos os grupos. Considerando que para além da actividade angiogénica, o TNF-α tem também propriedades inflamatórias e de regulação da proliferação e da adesão celular (**Leibovich e col. 1987**; **Mori e col. 1991**; **Iwabe e col. 2000**; **Gazvani e Templeton 2002**), ou seja, parece actuar em diferentes fases de desenvolvimento das lesões de endometriose, compreende-se que essa estabilidade esteja presente ao longo do ciclo menstrual. Da mesma forma que aconteceu para o VEGF, também observámos uma grande sobreposição de valores entre mulheres com e sem endometriose facto que deve desencorajar a sua utilização como teste de diagnóstico.

O aumento do número macrófagos no líquido peritoneal em doentes com endometriose tem sido extensamente reportado desde a década de 80 (**Halme e col. 1983**; **Olive e col. 1985**; **Dunselman e col. 1988**). Poder-se-ia esperar que desse aumento resultasse uma maior eficácia na eliminação dos fragmentos endometriais ectópicos, o que na realidade não acontece (**Halme e col. 1983**; **Olive e col. 1985**; **Dunselman e col. 1988**; **Surrey e Halme 1990**; **Lebovic e col. 2001**; **Harada e col. 2001**). Foi este tipo de evidência que fez levantar a hipótese de anomalias na resposta imunológica contribuírem para o desenvolvimento desta entidade (**Viniater e col. 1996**).

Sendo a endometriose uma doença caracterizada por uma activação de fenómenos inflamatórios (**Seli e col. 2003**) e a proteína C-reactiva uma proteína de fase aguda cujos níveis séricos estão aumentados na generalidade dos processos inflamatórios (**Matarese e col. 2000**), seria de esperar que as mulheres com endometriose apresentassem uma elevação desses valores séricos. Nos dois estudos publicados até ao momento onde se efectuou a comparação das concentrações séricas desta proteína em mulheres com e sem endometriose não foi possível confirmar esta possibilidade (**Abrao e col. 1997**; **Matarese e col. 2000**). **Abrao e col. (1997)** observaram um aumento apenas em doentes em estádio III e IV da classificação da ASRM, mas unicamente nos 3 primeiros dias do ciclo menstrual. Em contrapartida, **Matarese e col. (2000)** não encontraram qualquer diferença, embora não tenham controlado o grupo de casos para os diferentes estádios da classificação da ASRM.

No nosso estudo não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos da proteína C-reactiva entre os dois grupos de mulheres em qualquer uma das fases do ciclo. Essa ausência de diferenças pode, na nossa opinião, ficar a dever-se ao facto só termos incluído casos de endometriose em estádio III/IV da ASRM. Está bem documentada a má correlação entre a actividade da doença e a classificação da ASRM, podendo essa actividade ser

particularmente discreta em casos de doença avançada, sobretudo se esta tiver sido classificada com base na presença de endometriomas (**Vercellini e col. 1996; Roberts e Rock 2003**). Uma vez que nas mesmas doentes em que se verificou a inexistência de uma inflamação sistémica em curso foram documentados níveis séricos aumentados do VEGF e do TNF-α, o aumento destes dois factores na endometriose não deverá depender em exclusivo da presença de uma inflamação activa. Na nossa opinião estes resultados sustentam a hipótese da disfunção angiogénica representar um mecanismo autónomo na fisiopatologia da endometriose. No caso do TNF-α, a ausência de uma correlação positiva entre os seus níveis séricos e os da proteína C-reactiva reforça ainda mais essa possibilidade. A existência de uma correlação positiva entre as concentrações séricas da proteína C-reactiva e as do VEGF no grupo de doentes, indica que, tal como esperado, na presença de uma actividade inflamatória mais intensa do que a observada no nosso grupo de doentes poderíamos ter encontrado uma actividade angiogénica ainda mais proeminente.

A interacção entre o endométrio regurgitado e o mesotélio peritoneal ou a superfície do ovário, mediada por moléculas de adesão, representa um fenómeno indispensável para a ocorrência da implantação (**Spuijbroek e col. 1992; Martelli e col. 1993; Jeziorska e col. 1996; Osteen e col. 1996; van der Linden e col. 1996; Bruner e col. 1997; Kokorine e col. 1997; Witz e col. 1999**). Essas moléculas parecem estar também envolvidas na modulação da capacidade invasora das células endometriais ectópicas (**Gaetje e col. 1997; Darai e col. 1998; Scotti e col. 2000; Poncelet e col. 2002**). Sendo a caderina-E uma importante molécula de adesão das células epiteliais, seria de esperar que desempenhasse um papel importante em todo este processo. O seu envolvimento na invasão e metastização das células tumorais foi demonstrado indirectamente ao inibir-se a capacidade invasora dessas células quando se induziu a expressão da caderina-E, e do restabelecimento dessa capacidade após exposição a anticorpos monoclonais anti-caderina-E (**Vleminckx e col. 1991**). Atribui-se-lhe por esse motivo uma função supressora do desenvolvimento carcinogénico (**Behrens 1995**), tendo já sido observada a diminuição da sua expressão na membrana citoplasmática de diferentes células malignas (**Takeichi 1993**). A participação da caderina-E na fisiopatologia da endometriose não está, no entanto, clarificada. **Gaetje e col. (1997)** demonstraram que o endométrio ectópico apresenta um número significativamente maior de células epiteliais negativas para a caderina-E (logo com maior capacidade de invasão) quando comparado com o endométrio eutópico. Estes resultados foram posteriormente confirmados por diferentes autores (**Darai e col. 1998; Scotti e col. 2000; Poncelet e col. 2002**). Com base nestas observações concluíram que a perda de expressão da caderina-E constituía um importante mecanismo para a invasão na fisiopatologia da endometriose

(**Gaetje e col. 1997; Darai e col. 1998; Scotti e col. 2000; Poncelet e col. 2002**). Contudo, a demonstração de um padrão similar de expressão desta molécula nas células epiteliais de lesões peritoneais castanhas e nas do endométrio eutópico de mulheres saudáveis levantou dúvidas quanto ao seu verdadeiro envolvimento (**Beliard e col. 1997**). Essas dúvidas foram de igual forma estabelecidas por **Ota e Tanaka (1997)** depois de terem observado um aumento da expressão da caderina-E no endométrio eutópico de mulheres com endometriose comparativamente ao de mulheres sem a doença.

Também controverso é o significado dos valores séricos da forma solúvel da caderina-E nas doentes com endometriose. Apesar do seu aumento ter sido demonstrado em neoplasias do estômago, fígado, bexiga, pulmão e próstata (**Katayama e col. 1994; Griffiths e col. 1996; Gofuku e col. 1998; Cioffi e col. 1999; Kuefer e col. 2003; Juhasz e col. 2003**), as duas únicas publicações onde se faz referência à comparação dos níveis séricos desta molécula em mulheres com e sem endometriose apresentam resultados divergentes: **Jedryka e col. (2001)** observaram uma diminuição, ao passo que **Fu e Lang (2002)** notaram um aumento.

Uma diminuição significativa dos níveis séricos da caderina-E em mulheres com endometriose foi um resultado interessante por nós encontrado, particularmente dada a baixa variabilidade nas diferentes determinações efectuadas em cada participante ao longo do ciclo. A selecção dos casos de endometriose pode, em nossa opinião, justificar os nossos resultados e os resultados contraditórios dos dois estudos prévios, uma vez que nestes não foi discriminada essa selecção. A endometriose ovárica, a peritoneal superficial e a profunda infiltrativa, apesar de poderem ser incluídas no mesmo grupo de casos, parecem ter mecanismos fisiopatológicos diferentes (**Koninckx e Martin 1992; Vercellini e col. 2000; Vercellini e col. 2004**). A análise histológica de cortes seriados de ovários contendo endometriomas no seu interior permitiu concluir que os endometriomas não são mais que pseudocistos extra-ováricos cuja parede é formada pelo córtex ovárico invertido no local de um implante superficial (**Hughesdon 1957; Brosens e col. 1994**). Deste modo pode-se especular que a formação de endometriomas não é dependente de mecanismos de invasão, sendo mesmo incorrecta a sua inclusão nas formas de endometriose profunda infiltrativa. O mesmo acontece com a endometriose peritoneal superficial, onde as lesões, como o próprio nome indica, não apresentam uma grande actividade invasora. Pelo contrário, a endometriose profunda infiltrativa, nomeadamente a do septo rectovaginal, é considerada uma forma invasiva da doença (**Koninckx e Martin 1992; Vercellini e col. 2000; Vercellini e col. 2004**). Tendo em conta que a forma solúvel da caderina-E representa a degradação da molécula intacta da superfície celular nos processos regenerativos e sobretudo infiltrativos celulares, a diminuição dos níveis séricos de caderina-E observada nas nossas doentes poderá ter duas explicações: por um lado o facto de termos incluído apenas doentes

com formas não invasivas de endometriose (ovárica e peritoneal superficial), onde o ritmo de degradação da molécula intacta é relativamente discreto e, adicionalmente, pelo facto das células epiteliais que revestem internamente a parede dos endometriomas, forma de apresentação predominante nos nossos casos, estarem parcialmente isoladas da circulação sistémica pelo córtex ovárico invaginado, tornando mais difícil a libertação destas moléculas para a corrente sanguínea (**Somigliana e col. 2002**). Essa possibilidade foi sugerida após a observação de um aumento dos níveis séricos da ICAM-1, outra molécula de adesão produzida em grande quantidade pelo tecido endometrial e endometriótico, em doentes com formas profundas infiltrativas da doença mas não nas doentes com endometriomas (**Somigliana e col. 2002**). Deste modo, a selecção dos casos de endometriose para análise da caderina-E deve ter sempre em consideração as diferenças etiopatogénicas das formas de apresentação da doença.

Os nossos resultados permitem, por esse motivo, demonstrar que os fenómenos de invasão não desempenham um papel crucial no desenvolvimento dos endometriomas e das lesões peritoneais superficiais. A grande sobreposição de resultados entre mulheres com e sem endometriose retira-lhe no entanto valor como teste de diagnóstico.

O aumento dos níveis plasmáticos do CA 125 em mulheres com endometriose tem sido frequentemente referido na literatura (**Koninckx e col. 1992; O'Shaughnessy e col. 1993; Hornstein e col. 1995; Mol e col. 1998; Chen e col. 1998; Abrao e col. 1999; Harada e col. 2002; Somigliana e col. 2004**). Menos consistentes são as referências ao aumento do CA 19--9 nestas doentes (**Guerriero e col. 1996; Matalliotakis e col. 1998; Harada e col. 2002; Somigliana e col. 2004; Matalliotakis e col. 2004**). O valor de qualquer um destes marcadores tumorais para o diagnóstico da endometriose é no entanto limitado, pelo menos quando são utilizados os valores de referência propostos na literatura para discriminar entre lesões benignas e malignas (**Chen e col. 1998; Somigliana e col. 2004**). Optámos por realizar os doseamentos na fase proliferativa inicial do ciclo uma vez que foi já referido um pico máximo de concentração destes marcadores nesta fase, mesmo em mulheres sem endometriose, tendo daí resultado a recomendação actual para que o seu doseamento seja realizado durante ou imediatamente após o período menstrual (**Harada e col. 2002; Kafali e col. 2004**). A nossa observação de concentrações plasmáticas do CA 125 significativamente mais elevados nas mulheres com endometriose não é pois inesperada. No entanto, quando utilizados os valores de referência da literatura o valor da sensibilidade encontrado para este marcador tumoral na identificação de endometriose não foi muito animador, tendo sido particularmente baixo no caso do CA 19--9. Constatámos também que da associação de ambos não resultou qualquer melhoria do teste. Todavia, uma conclusão importante resulta do nosso estudo. Os valores de 35.00 UI/mL e 37.00

UI/mL, habitualmente utilizados como valores de referência respectivamente para o CA 125 e para o CA 19-9 na discriminação entre patologia benigna e maligna, não são os mais indicados quando utilizados na detecção de endometriose. Essa conclusão foi possível após termos redefinido, a partir das curvas ROC, o valor de referência de 35.00 UI/mL para 22.58 UI/mL no caso do CA 125 e de 37.00 UI/mL para 5.35 UI/mL no caso do CA 19-9. Com estes valores por nós calculados com base na população estudada, a eficácia do doseamento plasmático do CA 125 melhora significativamente, ao passo que no caso do CA 19-9 a melhoria que se observa na sensibilidade é conseguida à custa de uma depreciação do valor da especificidade.

A associação de ambos os marcadores adoptando os novos valores de referência também permitiu retirar conclusões importantes. Quando a positividade do teste fica condicionada à presença de valores positivos para ambos os marcadores tumorais observa-se uma alta especificidade aliada a uma sensibilidade muito aceitável. Resulta desta observação que com esse critério, a probabilidade de encontrarmos um teste positivo numa mulher sem doença é praticamente nula. Pelo contrário, se usada a condição de bastar um marcador tumoral ser positivo para que o teste se torne também ele positivo, então o teste terá uma alta sensibilidade, garantindo dessa forma que a probabilidade de encontrarmos testes negativos em mulheres com doença será muito baixa, mesmo que isso se faça à custa dum maior número de falsos positivos. Isto significa que a opção pelo critério a utilizar poderá depender da necessidade de usarmos um teste com maior sensibilidade ou maior especificidade.

Os resultados do nosso estudo permitem-nos, pois, discordar de **Somigliana e col. (2004)** que concluem pela não existência de vantagens na associação do CA 125 com o CA 19--9 na detecção de endometriose, apesar de também terem calculado, a partir de curvas ROC, novos valores de referência para estes marcadores. No entanto, as conclusões desse estudo foram, em nossa opinião, condicionadas pela utilização da IL-6 como terceiro marcador sérico de endometriose, de baixo valor discriminativo como reconhecem os próprios autores (**Somigliana e col. 2004**), uma vez que o valor do teste foi calculado em conjunto para estes três marcadores, não tendo sido especificado o seu valor quando considerada apenas a associação entre o CA 125 e o CA 19-9. Em contrapartida, a nossa observação está em concordância com a de **Harada e col. (2002)**, os primeiros autores a sugerirem a existência de uma vantagem em utilizar a associação desses dois marcadores na avaliação de doentes com endometriose. É importante realçar que o significado dos nossos resultados é em muito reforçado pelo facto do estudo de **Harada e col. (2002)** ter sido retrospectivo e não ter contemplado a questão da redefinição dos valores de referência do CA 125 e do CA 19-9 quando aplicados a doentes com endometriose.

Como conclusão, a nossa investigação para além de confirmar o interesse da utilização dos marcadores tumorais CA 125 e CA 19-9, isolados ou em associação, no estudo de mulheres

com endometriose, sugere que valores de referência mais baixos deverão ser considerados quando aplicados a estas doentes.

Referências

Abrao MS, Podgaec S, Filho BM, Ramos LO, Pinotti JA, de Oliveira RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. Hum Reprod 1997; 12:2523-7.

Abrao MS, Podgaec S, Pinotti JA, de Oliveira RM. Tumor markers in endometriosis. Int J Gynaecol Obstet 1999; 66:19-22.

American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997; 67:817-21.

Agrawal R, Conway GS, Sladkevicius P, Payne NN, Bekir J, Campbell S, et al. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in the normal menstrual cycle: association with changes in ovarian and uterine Doppler blood flow. Clin Endocrinol 1999; 50:101-6.

Audebert A, Backstrom T, Barlow DH, Benagiano G, Brosens I, Buhler K, et al. Endometriosis 1991: a discussion document. Hum Reprod 1992; 7:432-5.

Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. Am J Pathol 1995; 147:339-51.

Bausero P, Cavaille F, Meduri G, Freitas S, Perrot-Applanat M. Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. Angiogenesis 1998; 2:167-82.

Bazot M, Cortez A, Darai E, Rouger J, Chopier J, Antoine Jm, et al. Ultrasonography compared with magnetic resonance imaging for the diagnosis of adenomyosis: correlation with histopathology. Hum Reprod 2001; 16:2427-33.

Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. Hum Reprod 2002; 17:426-31.

Behrens J. Cell contact, differentiation and invasiveness of epithelial cells. Invasion Metastasis 1995; 14:61-81.

Beliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. Fertil Steril 1997; 67:266-72.

Brosens IA, Puttemans PJ, Deprest J. The endoscopic localization of endometrial implants in the ovarian chocolate cyst. Fertil Steril 1994; 61:1034-8.

Braun DP, Dmowski WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. Curr Opin Obstet Gynecol 1998; 10:365-9.

Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. J Clin Invest 1997; 99:2851-7.

Calhaz-Jorge C, Costa AP, Santos MC, Palma-Carlos ML. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in patients with endometriosis depend on the severity of the disorder and are higher in the luteal phase. Hum Reprod 2003; 18:593-7.

Chen FP, Soong YK, Lee N, Lo SK. The use of serum CA-125 as a marker for endometriosis in patients with dysmenorrhea for monitoring therapy and for recurrence of endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand 1998; 77:665-70.

Cioffi M, Gazzerro P, Di Finizio B, Vietri M, Di Macchia C, Puca GA, et al. Serum soluble E-cadherin fragments in lung cancer. Tumori 1999; 85:32-4.

Darai E, Leblanc M, Walker-Combrouze F, Bringuier AF, Madelenat P, Scoazrc JY. Expression of cadherins and CD44 isoforms in ovarian endometrial cysts. Hum Reprod 1998; 13:1346-52.

Darai E, Detchev R, Hugol D, Quang NT. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. Hum Reprod 2003; 18:1681-5.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998; 13:1686-90.

Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. J Reprod Fertil 1988; 82:707-10.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995; 146:1029-39.

Fasciani A, D'Ambrogio G, Bocci G, Monti M, Genazzani AR, Artini PG. High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata. Mol Hum Reprod 2000; 6:50-4.

Fasciani A, D'Ambrogio G, Bocci G, Luisi S, Artini PG, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian cystic pathology. Fertil Steril 2001; 75:1218-21.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocrinol Rev 1997; 18:4-25.

Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, et al. Vascular endothelial growth factor

is essential for corpus luteum angiogenesis. Nat Med 1998; 4:336-40.

Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med 1995; 333:1757-63.

Fu C, Lang J. Serum soluble E-cadherin level in patients with endometriosis. Chin Med Sci J 2002; 17:121-3.

Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. Am J Pathol 1997; 150:461-7.

Gagné D, Pagé M, Robitaille G, Hugo P, Gosselin D. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis. Hum Reprod 2003; 18:1674-80.

Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. Reprod 2002; 123:217-26.

Gofuku J, Shiozaki H, Doki Y, Inoue M, Hirao M, Fukuchi N, et al. Characterization of soluble E-cadherin as a disease marker in gastric cancer patients. Br J Cancer 1998; 78:1095-101.

Griffiths TR, Brotherick I, Bisohp RI, White MD, McKenna DM, Horne CH, et al. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. Br J Cancer 1996; 74:579-84.

Guerriero S, Ajossa S, Paoletti AM, Mais V, Angiolucci M, Melis GB. Tumor markers and transvaginal ultrasonography in the diagnosis of endometrioma. Obstet Gynecol 1996; 88:403-7.

Halme J, Becher S, Hammond MG, Raj MHG, Raj S. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1983; 145:333-7.

Harada T, Yoshioka H, Yoshida S, Iwabe T, Onohara Y, Tanikawa M, et al. Increased interleukin-6 concentrations in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1997; 176:593-7.

Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. Fertil Steril 2001; 76:1-10.

Harada T, Kubota T, Aso T. Usefulness of CA 19-9 versus CA 125 for the diagnosis of endometriosis. Fertil Steril 2002; 78:733-9.

Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. Hum Reprod Update 1998; 4:736-40.

Hornstein MD, Harlow BL, Thomas PP, Check JH. Use of a new CA 125 assay in the diagnosis of endometriosis. Hum Reprod 1995; 10:932-4.

Hughesdon PE. The structure of the endometrial cysts of the ovary. J Obstet Gynaecol Br Emp 1957; 44:481-7.

Hull MG, Savage PE, Bromham DR, Ismael AA, Morris AF. The value of a single serum progesterone measurement in the midluteal phase as a criterion of a potentially fertile cycle ("ovulation") derived from treated and untreated conception cycles. Fertil Steril 1982; 37:355-60.

Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Tanikawa M, Terakawa N. Tumor necrosis factor-α promotes proliferation of the endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:824-9.

Jedryka M, Goluda M, Kuliczkowski K, Sozanski L. E-cadherin in the serum and the peritoneal fluid of women with endometriosis. Ginekol Pol 2001; 72:418-21.

Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, Woolley DE. Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. J Reprod Fertil 1996; 107:43-51.

Juhasz M, Ebert MP, Schulz HU, Rocken C, Molnar B, Tulassay Z, et al. Dual role of serum soluble E-cadherin as a biological marker of metastatic development in gastric cancer. Scand J Gastroenterol 2003; 38:850-5.

Kafali H, Artuc H, Demir N. Use of CA 125 fluctuation during the menstrual cycle as a tool in the clinical diagnosis of endometriosis; a preliminary report. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 116:85-8.

Katayama M, Hirai S, Kamihagi K, Nakagawa K, Yasumoto M, Kato L. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. Br J Cancer 1994; 69:580-5.

Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbay E. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. Fertil Steril 1997; 68:246-51.

Koninckx PR, Martin D. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possible adenomyosis externa. Fertil Steril 1992; 58:924-8.

Koninckx PR, Riittinen L, Seppala M, Cornillie FJ. CA 125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with infiltrating pelvic endometriosis. Fertil Steril 1992; 57:523-30.

Kuefer R, Hofer MD, Gschwend JE, Pienta KJ, Sanda MG, Chinnaiyan AM, et al. The role of an 80 kDa fragment of E-cadherin in the metastatic progression of prostate cancer. Clin Cancer Res 2003; 9:6447-52.

Kumar-Singh S, Weyler J, Martin MJ, Vermeulen PB, van Marck E. Angiogenic cytokines in mesothelioma:

a study of VEGF, FGF-1 and -2, and TGF beta expression. J Pathol 1999; 189:72-8.

Kupker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K. Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. Hum Reprod Update 1998; 4:719-23.

Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. Biochem Biophys Res Commun 1993; 195:1005-10.

Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. Fertil Steril 2001; 75:1-10.

Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. Nature 1987; 329:630-2.

Mahnke JL, Dawood MY, Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril 2000; 73:166-70.

Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, Stavreus-Evers A, Tzonou A, Landgren BM. Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles. Fertil Steril 2004; 81:1322-7.

Martelli M, Campana A, Bischof P. Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. J Reprod Fertil 1993; 98:67-76.

Matalliotakis I, Neonaki M, Zolindaki A, Hassan E, Georgoulias V, Koumantakis E. Changes in immunologic variables (TNF-a, sCD8 and sCD4) during danazol treatment in patients with endometriosis. Int J Fertil Womens Med 1997; 42:211-4.

Matalliotakis I, Panidis D, Vlassis G, Neonaki M, Goumenou A, Koumantakis E. Unexpected increase of the CA 19-9 tumour marker in patients with endometriosis. Eur J Gynaecol Oncol 1998; 19:498-500.

Matalliotakis IM, Goumenou AG, Koumantakis GE, Neonaki MA, Koumantakis EE, Dionyssopoulou E. Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines. Int Immunopharmacol 2003; 3:81-9.

Matalliotakis IM, Goumenou AG, Mulayim N, Karkavitsas N, Koumantakis EE. High concentrations of the CA-125, CA 19-9 and CA 15-3 in the peritoneal fluid between patients with and without endometriosis. Arch Gynecol Obstet 2004 (in press).

Matarese G, Alviggi C, Sanna V, Howard JK, Lord GM, Carravetta C, et al. Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endoemtriosis. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:2483-7.

Mclaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. Hum Reprod 1996; 11:220-23.

Mclaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. Hum Reprod Update 2000; 6:45-55.

Meduri G, Bausero P, Perrot-Applanat M. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in the Human Endometrium: Modulation During the Menstrual Cycle. Biol Reprod 2000; 62:439-47.

Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:1-19.

Mol BWJ, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MAHM, Bongers MY, Bossuyt PMM, et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. Fertil Steril 1998; 70:665-70.

Mori H, Sawairi M, Nakagawa M, Itoh N, Wada K, Tamaya T. Peritoneal fluid interleukin-1β and tumour necrosis factor in patients with benign gynaecologic disease. Am J Reprod Immunol 1991; 26:62-7.

Naz RK, Butler A, Witt BR, Barad D, Menge AC. Levels of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in sera and cervical mucus of fertile and infertile women: implication in infertility. J Reprod Immunol 1995; 29:105-17.

O'Shaughnessy A, Check JH, Nowroozi K, Lurie D. CA 125 levels measured in different phases of the menstrual cycle in screening for endometriosis. Obstet Gynecol 1993; 81:99-103.

Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. Fertil Steril 1985; 44:772-7.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M, Koninckx PR. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. Fertil Steril 1993; 59:778-82.

Orre M, Rogers PA. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumors of the ovary. Int J Cancer 1999; 84:101-8.

Osteen KG, Bruner KL, Sharpe-Timms KL. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. Semin Reprod Endocrinol 1996; 14:247-55.

Ota H, Tanaka T. Integrin adhesion molecules in the endometrial glandular epithelium in patients with endometriosis or adenomyosis. J Obstet Gynaecol Res 1997; 23:485-91.

Overton C, Fernandez-Shaw S, Hicks B, Barlow D, Starkey P. Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain. Hum Reprod 1996; 11:380-6.

Packard CJ, O'Reilly DSJ, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N Engl J Med 2000; 343:1148-55.

Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simón C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. Fertil Steril 1998; 70:425-31.

Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. Endocrinology 1990; 127:965-7.

Poncelet C, Leblanc M, Walker-Combrouze F, Soriano D, Feldmann G, Madelenat P, et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand 2002; 81:195-203.

Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski WP. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. Fertil Steril 1996; 65:925-30.

Redmer DA, Reynolds LP. Angiogenesis in the ovary. Rev Reprod 1996; 1:182-92.

Reynolds K, Bicknell R. Angiogenesis in transvaginal colour Doppler. Bourne TH, Jauniaux E, Jurcovik D; Springer 1995; 13-9.

Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. J Anim Sci 1998; 76:1671-81.

Roberts CP, Rock JA. The current staging system for endometriosis: does it help? Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:115-32.

Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. J Biol Chem 1996; 271:28220-8.

Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. Mol Hum Reprod 2000; 6:610-7.

Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am 2003; 30:41-61.

Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:3112-8.

Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, et al. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. Cancer Res 1989; 49:2128-33.

Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gytai-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. J Clin Invest

1993; 91:2235-43.

Silva-Carvalho JL. Endométrio e função ovárica. Aspectos morfológicos e histeroscópicos. (Dissertação de Doutoramento), Faculdade de Medicina do Porto 1995.

Somigliana E, Vigano P, Candiani M, Felicetta I, Di Blasio AM, Vignali M. Use of serum-soluble intercellular adhesion molecule-1 as a new marker of endometriosis. Fertil Steril 2002; 77:1028-31.

Somigliana E, Vigano P, Tirelli AS, Felicetta I, Torresani E, Vignali M, et al. Use of the concomitant serum dosage of CA 125, CA 19-9 and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions. Hum Reprod 2004; 19:1871-6.

Spuijbroek MD, Dunselman GA, Menheere PP, Evers JL. Early endometriosis invades the extracellular matrix. Fertil Steril 1992; 58:929-33.

Steff AM, Gagne D, Page M, Rioux A, Hugo P, Gosselin D. Serum concentrations of insulin-like growth factor-1, soluble tumor necrosis factor receptor-1 and angiogenin in endometriosis patients. Am J ReprodImmunol. 2004; 51:166-73.

Surrey ES, Halme J. Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. Obstet Gynecol 1990; 76:792-7.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991; 251:1451-5.

Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. Curr Opin Cell Biol 1993; 5:806-11.

Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M. Comparison of cytokine concentrations and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 265-70.

Unkila-Kallio L, Vuorela-Vepsalainen P, Tiitinen A, Halmesmaki E, Ylikorkala O. No cyclicity in serum vascular endothelial growth factor during normal menstrual cycle but significant luteal phase elevation during an in vitro fertilization program. Am J Reprod Immunol 2000; 43:25-30.

van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW, Evers JL. Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes. Fertil Steril 1996; 65:76-80.

Vasconcelos C, Xavier P, Vieira AP, Martinho M, Rodrigues J, Bodas A, et al. Autoimmune progesterone urticaria. Gynecol Endocrinol 2000; 14:245-7.

Vercellini P, De Benedetti F, Rossi E, Colombo A, Trespidi L, Crosignani PG. Tumour necrosis factor in plasma

and peritoneal fluid of women with and without endometriosis. Gynecol Obstet Invest 1993; 36:39-41.

Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. Fertil Steril 1996; 65:299-304.

Vercellini P, Aimi G, Panazza S, Vicentini S, Pisacreta A, Crosignani PG. Deep endometriosis conundrum: evidence in favour of a peritoneal origin. Fertil Steril 2000; 73:1043-6.

Vercellini P, Frontino G, Pietropaolo G, Gattei U, Daguati R, Crosignani PG. Deep endometriosis: definition, pathogenesis, and clinical management. J Am Assoc Gynecol Laparosc 2004; 11:153-61.

Vignali M, Infantino M, Matrone R, Chiodo I, Somigliana E, Busacca M, et al. Endometriosis: novel ethiopathogenetic concepts and clinical perspectives. Fertil Steril 2002; 78:665-78

Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. Hum Reprod Update 1996; 2: 371-84.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. Cell 1991; 66:107-19.

Xavier P. Angiogénese Folicular. Será a sua identificação importante no tratamento da infertilidade? Arq Med 2000; 14:48-51.

Xavier P, Gomes F, Pereira A, Teixeira-Pinto A, Beires J, Martinez-de-Oliveira J. Níveis séricos do VEGF em diferentes fases do ciclo menstrual. Rev Ginecol Med Reprod 2002; 27:74 (resumo).

Xavier P, Beires J, Martinez-de-Oliveira J. Sub and endometrial blood flow in patients with endometriosis. Hum Reprod 2004; 19(Suppl.1):i168.

Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. Clin Obstet Gynecol 1999; 42:566-85.

Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Schenken RS. Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. Fertil Steril 1999; 71:56-60.

Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH. Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell--cell adhesion. J Cell Biochem 1987; 34:187-202.

Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis 2003. Am J Reprod Immunol 2003; 49:285-96.

Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. Gynecol Endocrinol 1997. 11:371-81.

Yan Z, Neulen J, Raczek S, Weich HA, Keck C, Grunwald K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. Gynecol Endocrinol 1998; 12:149-53.

Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such endometriosis. Hum Reprod 2002; 17:1415-23.

CAPÍTULO 5

Conclusões

Conclusões

Os estudos por nós efectuados permitiram retirar as seguintes conclusões:

1. A angiografia Doppler revelou ser um método capaz de efectuar a avaliação morfofuncional do endométrio uma vez que, para além da sua análise morfológica, permitiu detectar diferenças funcionais ao longo do ciclo menstrual (representadas fundamentalmente por diferenças no seu padrão vascular).

2. Ao ter sido capaz de detectar divergências na perfusão endometrial em mulheres com e sem endometriose, a angiografia Doppler demonstrou poder ser utilizada para identificar uma actividade angiogénica excessiva que possa ocorrer em mulheres com esta doença ou com risco aumentado de virem dela a padecer.

3. A confirmação laparoscópica em todas as 30 participantes da hipótese diagnóstica de endometrioma estabelecida com base no exame ultrasonográfico transvaginal, permite concluir que este constitui um excelente método de identificação destas lesões ováricas desde que executada por um operador experiente.

4. Confirmámos as observações de outros autores relativamente ao aumento da vascularização endometrial da fase proliferativa para a secretora em mulheres saudáveis. Com base na angiografia Doppler, descrevemos pela primeira vez esse aumento em mulheres com endometriose.

5. A endometriose condicionou um aumento significativo dos sinais de cor no endométrio, em particular na região intraendometrial, durante a fase secretora tardia do ciclo, ou seja, imediatamente antes da menstruação. O nosso trabalho foi pioneiro na demonstração, por métodos ultrasonográficos, de uma actividade angiogénica excessiva (por neovascularização e/ou vasodilatação) do endométrio de doentes com endometriose. Tendo como base a teoria da menstruação retrógrada, esta observação apoia a hipótese

da disfunção angiogénica endometrial poder estar envolvida na fisiopatologia da endometriose.

6. A análise comparativa dos padrões vasculares endometriais ao longo do ciclo menstrual em mulheres com e sem infertilidade não revelou diferenças significativas tanto no grupo de doentes como no de controlo. Não foi nosso objectivo estudar especificamente a relação entre a perfusão sanguínea endometrial e a fertilidade, motivo pelo qual não nos debruçamos especificamente sobre a vascularização endometrial durante a "janela implantatória". Pelo contrário, efectuámos essa análise com o intuito de avaliar se as diferenças por nós observadas nos índices de vascularização em mulheres com e sem endometriose poderiam ter resultado da maior prevalência de infertilidade nas primeiras. A nossa observação permitiu-nos concluir que, apesar da perfusão sanguínea endometrial poder ser influenciada pela presença de infertilidade, esta não foi responsável pelas diferenças por nós encontradas.

7. A observação de um aumento de sinais de cor na região intraendometrial durante a fase secretora tardia do ciclo em mulheres com endometriose permite concluir que a eventual presença simultânea de adenomiose subendometrial não foi a responsável em exclusivo pelo aumento da perfusão endometrial nestas mulheres. Esta conclusão resulta do reconhecimento de que, sendo a adenomiose capaz de aumentar a vascularização subendometrial, ela não tem qualquer influência sobre a actividade angiogénica da região intraendometrial.

8. As mulheres com endometriose apresentam concentrações séricas do VEGF significativamente mais elevados nas fases secretoras e aumentos próximos da significância nas fases proliferativas do ciclo menstrual. A observação do aumento sustentado deste factor durante todo o ciclo permite confirmar o seu envolvimento na fisiopatologia da endometriose.

9. Apesar das concentrações séricas do VEGF serem altamente dependentes da produção ovárica e endometrial, elas não reflectem de forma rigorosa a actividade angiogénica

cíclica destes dois órgãos, uma vez que se encontrou uma grande estabilidade nos seus níveis séricos ao longo do ciclo menstrual.

10. A grande sobreposição dos valores séricos do VEGF observados nos dois grupos exclui a possibilidade de utilização deste marcador para discriminar entre mulheres com e sem endometriose.

11. A nossa observação de que as doentes com endometriose apresentam um aumento significativo das concentrações séricas do TNF-α durante todo o ciclo menstrual sugere fortemente o envolvimento desta citocina na fisiopatologia da doença. Essa observação é reforçada pelo facto desse aumento ter sido confirmado em cada uma das quatro fases do ciclo. Por outro lado, a ausência de variações ao longo do ciclo menstrual dentro de cada um dos grupos pode ser justificada pelo facto da sua produção ser dependente dos macrófagos activados e não do ovário ou do endométrio.

12. A utilização da determinação do TNF-α sérico como teste de diagnóstico deve ser desencorajada tendo em conta a grande sobreposição de valores encontrados entre mulheres com e sem endometriose.

13. Apesar de se admitir que fenómenos inflamatórios locais pélvicos podem estar presentes na generalidade das doentes com endometriose, demonstrámos pela observação de concentrações séricas similares da proteína C-reactiva nas mulheres com e sem endometriose que, nas doentes em estádio III/IV da ASRM, definido fundamentalmente pela presença de endometriomas, não há uma inflamação sistémica activa. Esta nossa conclusão sustenta a noção de que a actividade inflamatória sistémica pode ser especialmente discreta em casos de doença avançada sobretudo se esta tiver sido classificada com base na presença de endometriomas.

14. O aumento dos níveis séricos do VEGF e do TNF-α nas doentes com endometriose não depende em exclusivo da presença de uma inflamação sistémica activa, uma vez que encontrámos um aumento destes dois factores nas mesmas doentes em que se verificou a inexistência de uma inflamação sistémica em curso. Na nossa opinião estes resultados sustentam a hipótese da disfunção angiogénica ser um mecanismo adicional na fisiopatologia da endometriose e não apenas a consequência da activação inflamatória.

15. Na presença de uma actividade inflamatória mais exuberante será de esperar uma produção ainda mais proeminente do VEGF, tendo em conta a correlação positiva por nós encontrada entre este factor angiogénico e a proteína C-reactiva nas mulheres com endometriose.

16. Demonstrámos a existência de uma diminuição significativa dos níveis séricos da caderina-E em mulheres com endometriose ao longo do ciclo menstrual, observação reforçada pela baixa variabilidade encontrada nas quatro determinações que foram realizadas em cada participante durante o estudo. O facto de todas as mulheres do grupo de casos apresentarem doença em estádio III/IV da ASRM, definida pela presença de endometriose peritoneal superficial e endometriomas e ausência de lesões profundas infiltrativas, permite extrapolar os resultados especificamente para as duas primeiras formas de apresentação da doença. Desse modo, tendo em conta que a forma solúvel da caderina-E representa a degradação da molécula intacta nos processo regenerativos e infiltrativos celulares, a observação de baixos níveis séricos nas nossas doentes reflecte uma menor libertação a partir dos tecidos epiteliais ou um menor acesso destas moléculas à corrente sanguínea. Os nossos resultados sugerem pois que a invasão não deverá ser um fenómeno determinante na fisiopatologia da endometriose peritoneal superficial ou dos endometriomas.

17. Observámos uma importante sobreposição nas concentrações da caderina-E no soro de mulheres com e sem endometriose, facto que retira a este marcador sérico valor como teste de diagnóstico de endometriose.

18. As mulheres com endometriose apresentaram um aumento significativo das concentrações plasmáticas do marcador tumoral CA 125. No que se refere ao seu valor como teste discriminativo de endometriose verificámos, no entanto, que o valor de referência de 35.00 UI/mL, proposto para discriminar lesões benignas de malignas do ovário não é o mais indicado para aplicação à endometriose. Retirámos essa conclusão após termos verificado que a redefinição do valor de referência de 35.00 UI/mL para 22.58 UI/mL, com base no cálculo a partir das curvas ROC, permitiu uma melhoria significativa da sensibilidade (72.0% versus 48.0%), sem que isso condicionasse qualquer detrimento na especificidade (92.3%).

19. No que diz respeito ao CA 19-9 as diferenças observadas ficaram próximas da significância com valores mais elevados no grupo de doentes. No entanto, apesar da alta especificidade e alto valor predictivo positivo, este marcador revelou ter uma baixa sensibilidade e baixo valor predictivo negativo quando se utilizou o valor de referência de 37.00 UI/mL. A redefinição do valor de referência para 5.35 UI/mL tendo por base a população por nós estudada e o cálculo a partir das curvas ROC, permitiu observar uma melhoria significativa da sensibilidade (80.0% versus 8.0%), embora neste caso à custa de uma depreciação do valor da especificidade (53.9% versus 100%).

20. A associação do CA 125 com o CA 19-9 mostrou-se vantajosa na detecção de endometriose quando utilizados os valores de referência por nós calculados. Obviamente que o valor do teste será diferente conforme utilizarmos o critério "um e outro positivos" ou o critério "um ou outro positivo". No primeiro caso teremos um teste com alta especificidade, ou seja, um teste onde a probabilidade de encontrarmos um falso positivo é praticamente nula. No segundo caso o teste terá uma alta sensibilidade, garantindo dessa forma que a probabilidade de falsos negativos será baixa. A opção pelo critério de positividade a utilizar fica, por esse motivo, dependente da necessidade de usarmos um teste com maior especificidade ou maior sensibilidade.

CAPÍTULO 6

Resumo, Summary

6.1. Resumo

A necessidade de clarificar os mecanismos fisiopatológicos da endometriose, partindo da hipótese de uma actividade angiogénica disfuncional poder caracterizar o endométrio de mulheres com endometriose, determinou o estudo da vascularização endometrial ao longo do ciclo menstrual com recurso à angiografia Doppler. Para além deste estudo, considerámos oportuna a avaliação de factores séricos com reconhecida actividade angiogénica, inflamatória, de regulação da adesão e da proliferação celular, mecanismos reconhecidamente envolvidos no desenvolvimento da doença. Nessa perspectiva determinámos, em mulheres com e sem endometriose, os níveis séricos do "vascular endothelial growth factor" (VEGF), do "tumor necrosis factor-alfa" (TNF-α), da proteína C-reactiva e da caderina-E ao longo de um ciclo menstrual. A aferição do valor dos marcadores tumorais CA 125 e CA 19-9 como teste de diagnóstico na detecção de endometriose, tendo por base a população por nós estudada, foi outro dos objectivos do nosso estudo (capítulo 1).

Após uma breve introdução onde a questão da definição e os dados epidemiológicos mais relevantes da endometriose mereceram particular atenção (capítulo 2.1), efectuámos uma revisão sobre a evolução nos conceitos relativos à etiopatogénese, nomeadamente no que diz respeito às diferentes teorias que têm sido propostas para explicar a fisiopatologia da doença (capítulo 2.2). Enfatizámos a importância das diferentes formas de apresentação da endometriose (ovárica, nodular profunda e peritoneal) e as implicações clínicas do seu reconhecimento (capítulo 2.3), enquanto efectuámos uma análise da fisiopatologia da endometriose à luz dos conhecimentos actuais no campo da biologia molecular, com especial ênfase para os mecanismos envolvidos na implantação e sobrevivência das células endometriais ectópicas (capítulo 2.4).

No capítulo 3 descrevemos um estudo longitudinal realizado ao longo do ciclo menstrual que teve por objectivo determinar o padrão vascular do endométrio em mulheres com e sem endometriose. Efectuámos uma análise crítica dos aspectos metodológicas adoptados, nomeadamente no que diz respeito à opção pela angiografia Doppler, justificada pela alta sensibilidade para detecção vascular, sobretudo quando aplicada ao estudo de fluxos sanguíneos de baixa velocidade como é o caso da perfusão endometrial. Outros aspectos metodológicos abordados relacionaram-se com os critérios utilizados para a selecção das participantes no estudo e com a metodologia que permitiu excluir a infertilidade ou a presença de lesões

simultâneas de adenomiose subendometrial como responsáveis por potenciais enviesamentos nos resultados encontrados.

A observação de que as mulheres com endometriose apresentam um aumento significativo da actividade angiogénica endometrial na fase secretora tardia do ciclo, ou seja, imediatamente antes da disseminação celular que ocorre durante a menstruação, constituiu a nossa principal conclusão. Este facto sugere fortemente a participação da disfunção angiogénica na fisiopatologia da endometriose, uma vez que a uma maior actividade angiogénica endometrial corresponde um maior potencial para a implantação fora da cavidade uterina. Concluímos que a angiografia Doppler é um método capaz de detectar fenómenos de vascularização endometrial excessiva, circunstância que permite evoluir de uma simples avaliação morfológica para uma avaliação simultaneamente morfológica e funcional, ou seja, morfofuncional. Esta técnica mostrou-se adequada para a detecção de desvios funcionais do endométrio relacionados com a endometriose e seguramente com outras entidades clínicas que afectem o endométrio.

Realizámos uma análise das concentracções de diferentes factores séricos e plasmáticos ao longo do ciclo menstrual em mulheres com e sem endometriose (capítulo 4). Antes da apresentação e discussão dos resultados, expusemos a fundamentação da escolha dos diferentes marcadores estudados, tendo sido a sua participação nos diferentes mecanismos fisiopatológicos da endometriose a principal razão da nossa escolha. Os resultados encontrados permitiram confirmar o envolvimento do VEGF e do TNF-α na fisiopatologia da doença, ao mesmo tempo que excluíram a hipótese do aumento dos níveis séricos destes dois factores angiogénicos ser dependente de uma actividade inflamatória sistémica em curso. Demonstrámos a existência de uma diminuição dos níveis séricos da molécula de adesão caderina-E nas formas de endometriose peritoneal superficial e ovárica. Esta diminuição indica que os mecanismos de invasão não serão os mais importantes na génese destas formas de apresentação da endometriose, sugerindo, pelo contrário um maior envolvimento dos fenómenos de adesão ou um menor acesso destas moléculas à corrente sanguínea. A análise das concentrações plasmáticas do CA 125 e CA 19-9 como testes de detecção de endometriose permitiu propor novos valores de referência para estes dois marcadores tumorais. Permitiu igualmente demonstrar a vantagem da sua associação para detecção da doença.

Finalmente, no capítulo 5 sumariámos as conclusões de toda a contribuição pessoal para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos e dos marcadores sistémicos da endometriose.

6.2. Summary

Ethiopatogenic mechanisms involved in endometriosis must be clarified. Since excessive endometrial angiogenesis has been considered a potential contributor to the early steps of endometriosis development we aimed to compare, using power Doppler ultrasound, endometrial blood flow along the menstrual cycle between women with and without endometriosis. Additionally we believed that the evaluation of serum factors with angiogenic, inflammatory, cellular adhesion and proliferative properties, mechanism known to be involved in the development of the disease, could be an important contribution to that clarification. Using serial serum levels determinations of vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor-alfa (TNF-α), C-reactive protein and E-cadherin throughout the menstrual cycle, we compared those serum concentrations in women with and without endometriosis. To evaluate the performance of plasma CA 125 and CA 19-9 assays in detecting endometriosis was another goal of this study (chapter 1).

Following a brief introduction concerning the definition and epidemiologic aspects of endometriosis (chapter 2.1), a critical review of the ethiopathogenic theories that have been proposed is presented (chapter 2.2). In the same chapter we described different presentation forms of endometriosis (ovarian, peritoneal and deep rectovaginal) and discussed the clinical implications of its recognition (chapter 2.3). Additionally we analyzed the most recent concepts in molecular biology applied to endometriosis' physiopathology, with a special emphasis on mechanisms involved in the implantation and survival of ectopic endometrial cells (chapter 2.4).

In chapter 3 we described a longitudinal study performed throughout the menstrual cycle in women with and without endometriosis aimed to compare endometrial blood flow using power Doppler ultrasound. A critical review of some methodological aspects adopted in this study is presented. The option to use power Doppler ultrasound to evaluate endometrial blood flow is justified based on its higher sensitivity to detect low velocity blood, even close to zero, as it is the case of endometrial perfusion. Other methodological issues are addressed, namely the criteria adopted to select women with and without endometriosis and the possible confounder to our results of the reported association between endometriosis, infertility and simultaneous subendometrial adenomyosis.

A higher endometrial blood flow observed in women with endometriosis in the late secretory phase of the menstrual cycle, close to menstrual shedding, was the main finding of

our study. Since excessive endometrial angiogenesis was proposed as an important factor to explain why the endometrium of patients with endometriosis is characterized by a higher potential to implant and develop outside the uterus, our observation supports that proposal. We also concluded that power Doppler ultrasound can be a valuable tool for the detection of that disproportionate endometrial vascularization, confirming its value as a method to provide information both on morphological and functional endometrial parameters.

In chapter 4 an evaluation of serum and plasma levels of different factors along the menstrual cycle in women with and without endometriosis is described. The option for those studied markers was justified regarding their key role in mechanisms known to be involved in the ethiopathogenesis of endometriosis. Our study showed that patients with ovarian endometriosis had significantly higher VEGF and TNF-α serum levels along the menstrual cycle, suggesting their involvement in endometriosis' physiopathology. Additionally we confirmed that the increased serum levels of those angiogenic factors cannot be attributable exclusively to an ongoing systemic inflammatory process. We also observed significantly lower E-cadherin serum levels in patients with superficial peritoneal and ovarian endometriosis. This observation suggests that invasive mechanisms are not supposed to play a key role in the development of those two presentation forms of endometriosis, suggesting, in contrast, a major role for adhesion or a more difficult systemic release of this molecule from endometriotic cells within endometriomas, partially isolated from blood circulation. Furthermore our results showed that the accuracy of CA 125 and CA 19-9 for the detection of endometriosis may be improved by using lower cut-off values than those usually employed to discriminate between malignant and non-malignant pathology. The combined results of both markers may be considered for further improvement of the test performance.

Finally, in chapter 5 the conclusions of all the personal contribution to the investigation on physiopathology and systemic markers of endometriosis are presented.

