



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA A ATRIBUIÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO  
EM MEDICINA**

**SIMONE FILIPA CARRASQUEIRA SUBTIL**

***ENDOMETRIOSE: AMBIENTE SUBCELULAR,  
CA-125 E EVOLUÇÃO COM O TRATAMENTO  
HORMONAL***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:**

**PROFESSORA DOUTORA ISABEL TORRAL**

**PROFESSORA DOUTORA MARGARIDA DIAS**

**SETEMBRO/2013**

## Índice

1. Resumo/ <i>Abstract</i> .....	3
2. Introdução.....	5
3. Métodos.....	8
4. Alterações no ambiente subcelular na endometriose.....	9
5. O CA-125 como biomarcador da endometriose.....	14
6. Efeitos no ambiente subcelular e nos níveis de CA-125 com o tratamento hormonal	
6.1. Evolução com os estroprogestativos orais.....	21
6.2. Evolução com os análogos da GnRH.....	25
6.3. Evolução com o sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel.....	30
7. Endometriose: perspectivas futuras.....	34
8. Conclusão.....	38
9. Agradecimentos.....	43
10. Referências bibliográficas.....	44

## 1. Resumo

A endometriose é uma doença caracterizada pela existência de glândulas endometriais e de estroma endometrial em localizações ectópicas, que pode comprometer significativamente a qualidade de vida de mulheres em idade fértil. A sua etiologia permanece incerta, uma vez que a menstruação retrógrada, o mecanismo habitualmente proposto, não justifica na totalidade o processo de fixação dos implantes. No entanto, a apoptose e a proliferação celular, processos fundamentais à homeostasia do tecido endometrial, apresentam alterações no endométrio de mulheres que sofrem desta patologia, o que poderá ajudar a explicar a sua etiopatogenia.

A laparoscopia é o único método de diagnóstico definitivo para a endometriose. Uma vez que se trata de um procedimento invasivo, existe a necessidade de avaliar outros métodos mais inócuos que permitam o diagnóstico desta doença. Deste modo, o CA-125 tem sido proposto como o biomarcador mais promissor. No entanto, isolado ou em associação, este biomarcador carece de validação.

O tratamento hormonal constitui a base do tratamento da endometriose, demonstrando eficácia e segurança no controlo dos sintomas associados a esta doença. Os seus efeitos estendem-se ao nível subcelular, interferindo com a regulação da apoptose e da proliferação celular.

Neste sentido, os objectivos deste artigo de revisão são determinar as principais alterações no ambiente subcelular na endometriose, referentes aos factores que regulam a apoptose e a proliferação celular, a avaliação do CA-125 quanto ao seu valor diagnóstico, e de que modo todos estes factores evoluem com o tratamento hormonal.

Palavras-chave: endometriose, apoptose, Bcl-2, Bax, proliferação celular, CA-125, estroprogestativos orais, análogos da GnRH, sistema intrauterino de liberação de levonorgestrel

## ***1. Abstract***

*Endometriosis is a disease characterized by the existence of endometrial glands and stroma in ectopic localization, which can compromise significantly the quality of life of women in childbearing age. Its etiology remains uncertain, since the retrograde menstruation, the commonly proposed mechanism, does not completely explain the implants fixation process. However, apoptosis and cellular proliferation, fundamental processes to endometrial tissue homeostasis, present changes in the endometrium of women who suffer from this disease, which may help explain its pathogenesis.*

*Laparoscopy is the only definitive method of diagnosis for endometriosis. Since it is a invasive procedure, there is a need to evaluate other more innocuous methods for the diagnosis of endometriosis. Thus, CA-125 has been proposed as the most promising biomarker. However, either alone or in combination, this biomarker lacks validation.*

*Hormonal treatment is the basis of endometriosis treatment, showing efficacy and safety in controlling the symptoms associated with this disease. Its effects extend to the subcellular level, interfering with the regulation of apoptosis and cellular proliferation.*

*Therefore, the objectives of this review are to determine the main subcellular environment changes in endometriosis, referring to the factors that regulate apoptosis and cellular proliferation, to evaluate the CA-125 regarding its diagnostic value, and how all these factors evolve with the hormonal treatment.*

*Key-words: endometriosis, apoptosis, Bcl-2, Bax, cellular proliferation, CA-125, oral estroprogestatives, GnRH analogues, levonorgestrel-releasing intrauterine system*

## **2. Introdução**

A endometriose (EDM) é uma doença estrogénio-dependente, definida histologicamente como a presença de glândulas endometriais funcionantes e de estroma endometrial fora da cavidade uterina [1]. A formação de aderências na escavação pélvica e de endometriomas nos ovários constituem os principais processos patológicos, associados a fibrose dos tecidos, num ambiente inflamatório crónico [2]. É uma patologia enigmática que afecta cerca de 15% das mulheres em idade fértil [3,4], cuja clínica se caracteriza por dismenorreia secundária intensa, dispareunia profunda, dor pélvica e infertilidade, levando frequentemente a uma diminuição grave da qualidade de vida [2,5].

A menstruação retrógrada é o mecanismo etiológico habitualmente considerado na endometriose. No entanto, terá que estar presente uma susceptibilidade genética ou imunohistoquímica [2], designadamente uma desregulação da apoptose e da proliferação celular que esteja na origem da sobrevivência dos implantes [6], uma vez que o fluxo retrógrado não é exclusivo das mulheres com endometriose [2].

O diagnóstico definitivo desta doença é possível apenas com a laparoscopia [2,7,8], o que faz com que a maior parte das doentes inicie o tratamento médico empiricamente, sendo diagnosticadas com base em factores clínicos, exame físico e ecografia transvaginal [9]. Nasce então a necessidade de encontrar um biomarcador com elevado valor diagnóstico, que aliado à imagiologia e à clínica permita chegar a um diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade, evitando assim a necessidade de recorrer à laparoscopia.

O tratamento hormonal constitui o tratamento de primeira linha da endometriose, atingindo resultados eficazes no controlo dos sintomas e da progressão da doença. Constitui o pilar fundamental no tratamento da EDM, uma vez que evita o recurso à cirurgia, que apesar de possibilitar a remoção dos implantes, não diminui significativamente a elevada taxa de recorrência das lesões e da dor [10], nem a exposição ao risco cirúrgico, nomeadamente a formação de aderências pós-cirurgia. O tratamento hormonal actual inclui os estroprogestativos orais, os análogos da GnRH e o sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel (para a endometriose interna).

Os estroprogestativos orais são o tratamento de eleição na endometriose (ligeira a moderada), aliviando a dismenorreia em cerca de 75% das mulheres tratadas [7,11,12,13], a dispareunia profunda e a dor pélvica [7], melhorando indubitavelmente a sua qualidade de vida [12,13]. A utilização de estroprogestativos como terapêutica de eleição para a endometriose previne a exposição das doentes a cirurgias com elevado risco de morbilidade, frequentemente associadas a elevadas taxas de recorrência de dor e de persistência dos implantes [13,14]. O tratamento contínuo promove a atrofia dos implantes pélvicos [6,13], interferindo a nível molecular, promovendo a apoptose e diminuindo a proliferação celular [6].

Os análogos da GnRH possuem uma eficácia bem comprovada na prevenção da recorrência dos implantes de endometriose e no manuseamento da dor, com resultados semelhantes aos atingidos pelos estroprogestativos. No entanto, a sua utilização máxima limita-se a um período de 6 meses devido aos seus efeitos secundários resultantes do hipoestrogenismo induzido [10]. Os análogos têm efeitos a nível subcelular, aumentando a sensibilidade das células à apoptose [15], provocando também uma diminuição dos valores de CA-125 [16].

O sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel (Mirena ®) é uma opção terapêutica relevante para mulheres com endometriose interna (adenomiose), sendo eficaz no tratamento da dor e na regressão do endométrio ectópico [11,17,18]. Promove também a nível molecular uma redução da proliferação celular e aumento da apoptose [17,19], provocando a diminuição dos níveis de CA-125 [20].

Deste modo, pretendo com este artigo de revisão enunciar as principais alterações do ambiente subcelular na endometriose referentes à regulação da apoptose e da proliferação celular, avaliar o biomarcador mais estudado até ao momento, o CA-125, quanto ao seu valor clínico e diagnóstico, isoladamente ou em associação, e de que modo todos estes factores evoluem com a instituição do tratamento hormonal, especificamente com os estroprogestativos orais, os análogos da GnRH e o Mirena ®.

### 3. Métodos

Para a realização deste artigo de revisão foi executada uma pesquisa na base de dados electrónica PubMed, com o objectivo de identificar todos os artigos científicos e artigos de revisão realizados entre o ano 2000 e o ano 2013, publicados na língua inglesa ou na língua portuguesa e realizados na espécie humana. Foram usadas combinações das seguintes palavras-chave: "endometriose", "apoptose", "Bcl-2", "Bax", "CA-125", "biomarcador", "tratamento", "estroprogestativos", "contraceptivos orais", "análogos da GnRH" e "sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel". Todos os artigos pertinentes foram recuperados, assim como as referências destes mesmos artigos que se apresentassem relevantes para o cumprimento dos objectivos deste artigo de revisão.

Após análise atenta dos artigos seleccionados, foram excluídos os estudos realizados em mulheres que não apresentavam o diagnóstico de endometriose/adenomiose.

Os artigos não excluídos foram categorizados quanto aos objectivos propostos para esta revisão.

Relativamente às alterações no ambiente subcelular referentes à apoptose e à proliferação celular na endometriose foram seleccionados 7 artigos, que incluíram o estudo do proto-oncogene Bcl-2 e do Bax. Não foram encontrados artigos que comparassem o sistema Fas/FasL entre o endométrio de mulheres com EDM e o endométrio normal.

Foram seleccionados 12 artigos que relacionaram o CA-125 com a endometriose, com o objectivo de avaliar o seu valor diagnóstico, isoladamente ou em associação com outros biomarcadores.

De seguida foram revistos artigos que relacionaram a evolução dos factores alterados no ambiente subcelular e do CA-125 com a instituição do tratamento hormonal na endometriose: relativamente ao tratamento com estroprogestativos foram incluídos 3 artigos que relataram a evolução dos factores da apoptose e da proliferação celular, não tendo sido encontrado nenhum artigo que relacionasse a evolução do CA-125 com esta medicação; referentes aos análogos da GnRH foram seleccionados 4 artigos relativos às modificações no processo apoptótico e proliferativo e 5 artigos com a evolução do CA-125 com os seguintes análogos: acetato de leuprolide, nafarelin, goserelin e acetato de buserelin; por fim, quanto ao tratamento com o Mirena® foram seleccionados 3 artigos que relacionaram a evolução dos factores da apoptose e da proliferação celular e 1 artigo com a evolução do CA-125.

#### **4. Alterações no ambiente subcelular na endometriose**

A apoptose, uma forma de morte celular programada e sem resposta inflamatória associada, desempenha um papel fundamental na homeostasia dos tecidos, nomeadamente durante as variações do ciclo menstrual [3], estabelecendo um equilíbrio adequado com a proliferação celular. Ela promove a eliminação de células senescentes da camada funcional do endométrio durante a fase secretora tardia e durante a menstruação [3]. Esta homeostasia está alterada na endometriose, onde foram encontradas alterações no endométrio ectópico e eutópico que não estão presentes nos tecidos de mulheres saudáveis [3], designadamente uma desregulação da apoptose e da proliferação celular, que poderá explicar a capacidade de sobrevivência extraordinária dos implantes ectópicos. Estas alterações a nível do endométrio

eutópico sugerem que este é o local primário do processo patológico, que irá ser responsável pelo desenvolvimento da EDM.

A apoptose foi quantificada em diversos estudos [6,15,21], que evidenciaram valores significativamente mais baixos no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação com os grupos de controlo. Este resultado vem ao encontro do reportado por Dmowski WP *et al* [22], que demonstrou que a percentagem de apoptose no epitélio glandular do endométrio era reduzida entre as pacientes com endometriose, principalmente durante a fase secretora tardia/menstruação e durante a fase proliferativa precoce, sendo que esta diminuição era independente do ciclo menstrual segundo Imai A *et al* [15]. Além disso, Dmowski WP *et al* [22] evidenciou que nas mulheres com endometriose as variações da taxa de apoptose que ocorrem durante o ciclo menstrual são atenuadas, sendo que esta diminuição é demonstrada nas glândulas endometriais, mas não no estroma [22]. Imai A *et al* [15] demonstrou ainda que a apoptose estava diminuída de uma forma mais acentuada nas células endometriais ectópicas, quando comparadas com as células eutópicas de doente com EDM. Johnson MC *et al* [23] verificou que o aumento esperado de células apoptóticas durante a fase secretora tardia não ocorreu no endométrio eutópico com endometriose [23].

Existe uma clara deficiência na indução da apoptose nas células endometriais de mulheres com EDM, o que justifica a capacidade de sobrevivência aumentada nestas células em localizações ectópicas. Uma vez que esta alteração da homeostasia celular foi identificada no endométrio eutópico, é sugerido que o processo patofisiológico tenha início na cavidade uterina. No entanto, foram observadas diferenças entre o endométrio ectópico e eutópico de mulheres com EDM, nomeadamente uma diminuição da apoptose relativamente aos valores, já eles diminuídos, do endométrio eutópico, o que poderá sugerir que a desregulação da apoptose pode afinal não explicar todo o processo patogénico, podendo haver a intervenção de um ambiente alterado no fluido peritoneal, nomeadamente um ambiente local

imunotolerante que permita o desenvolvimento dos implantes ectópicos. Esta proposta explicaria em parte a razão pela qual esta doença apenas se desenvolve em certas mulheres, uma vez que a menstruação retrógrada é um processo fisiológico e comum.

A apoptose é controlada por duas vias: a via mitocondrial e a via do receptor de morte celular. A via mitocondrial, que utiliza as mitocôndrias para amplificar o sinal de morte celular, o que resulta na activação das caspases que levam à apoptose, é controlada por um conjunto de genes do qual faz parte o Bcl-2. O Bcl-2 é um proto-oncogene que bloqueia a apoptose, aumentando assim a sobrevivência celular [6]. Foi demonstrado um aumento da expressão deste gene no endométrio eutópico em fase proliferativa de mulheres com endometriose comparativamente com os níveis encontrados no endométrio de mulheres saudáveis [6]. Segundo Meresman GF *et al* [21], nas amostras de endométrio de mulheres com endometriose, a expressão de Bcl-2 atingiu um pico mais elevado durante a fase proliferativa tardia comparativamente com as amostras de mulheres saudáveis, mas desapareceu durante a fase secretora tardia, não havendo correlação significativa entre esta redução nesta fase e a distribuição de células apoptóticas, que se encontra diminuída em mulheres com endometriose, independentemente da fase do ciclo menstrual.

O estudo de Meresman GF *et al* [6] apenas incluiu amostras de endométrio eutópico em fase proliferativa, pelo que não se poderá verificar uma concordância com os resultados de Meresman GF *et al* [21]. O desaparecimento da expressão de Bcl-2 durante a fase secretora tardia poderá sugerir que a sua acção seja mais relevante durante a fase proliferativa. Mas é de considerar a hipótese de que poderá ter ocorrido algum erro de metodologia, uma vez que a amostra estudada era muito reduzida (n=14). Todavia, a diminuição da apoptose foi constante ao longo de todo o ciclo menstrual, pelo que se poderá colocar a hipótese de que esta se manteve devido à acção de outros mecanismos anti-apoptóticos, como por exemplo, uma diminuição da ligação do Fas/FasL. Apesar desta incongruência, os níveis de Bcl-2 estavam

elevados nos dois estudos durante a fase proliferativa, comparativamente com os resultados obtidos em mulheres saudáveis, pelo que se poderá propor que esta alteração possa estar na base da diminuição da apoptose verificada no endométrio de mulheres com EDM.

A proteína Bax, pertencente à família do gene Bcl-2, antagoniza a sobrevivência induzida pelo Bcl-2. A razão Bcl-2/Bax determina a susceptibilidade aos estímulos apoptóticos, sendo que concentrações superiores de Bax promovem a apoptose [6]. Há uma diminuição da sua expressão nas amostras de endométrio eutópico em fase proliferativa na EDM [6]. De acordo com Johnson MC *et al* [23], o mRNA do Bax aumentou 42% na fase secretora precoce e reduziu 63% na fase secretora tardia no endométrio de mulheres com endometriose comparativamente ao endométrio normal. As células endometriais proliferativas de mulheres com endometriose eram imunonegativas para esta proteína quando comparadas com os controlos, sendo que o padrão e a intensidade de fixação eram variáveis na fase secretora tanto no endométrio de mulheres com EDM como no endométrio normal [21].

O gene pro-apoptótico Bax apresenta-se diminuído no endométrio proliferativo de mulheres com EDM, comparativamente com o grupo de controlo, o que, em associação com os resultados obtidos pelo Bcl-2, pode explicar a diminuição da apoptose verificada nas mulheres com esta patologia. No entanto, durante a fase secretora os resultados são inconclusivos, uma vez que, apesar de Johnson MC *et al* [23] demonstrar uma redução significativa na expressão de Bax durante a fase secretora tardia em mulheres com EDM, que pode explicar a redução da apoptose verificada na mesma fase, evidenciou também um aumento significativo deste gene na fase secretora precoce, comparativamente com o grupo de controlo. Meresman GF *et al* [21] demonstrou um aumento do Bax nos dois grupos durante a fase secretora, que foi mais acentuado no grupo de controlo, o que sugere que este gene possa facilitar a preparação para o processo apoptótico verificado durante a menstruação em mulheres saudáveis. Estes resultados em mulheres com EDM necessitam de validação, uma

vez que a diminuição da apoptose nesta patologia, independentemente da fase do ciclo menstrual, é uma constante em diversos estudos [15,21].

O sistema Fas/FasL, ou via dos receptores de morte, consiste no segundo mecanismo de activação da apoptose, que ocorre quando o Fas se liga ao seu ligando. Apesar da expressão de Fas não se alterar durante o ciclo menstrual, a expressão de FasL aumenta durante a fase secretora e menstrual, o que vem ao encontro do papel da apoptose no ciclo menstrual no endométrio [24]. Até ao momento, não foi encontrado nenhum estudo que comparasse a expressão do Fas ou do FasL entre os implantes de endometriose e células endometriais normais. Apenas Harada T *et al* [25] referenciou que os níveis de FasL séricos e no fluído peritoneal estão mais elevados em mulheres com EDM, o que pode levar ao aumento da apoptose das células do sistema imunitário que possuam o Fas, diminuindo assim a capacidade de eliminação das células endometriais ectópicas, por parte do sistema imunitário, na cavidade peritoneal.

A expressão da proteína humana Ki-67 está associada à proliferação celular, apresentando uma boa correlação com os índices mitóticos do endométrio humano [23]. Foi demonstrado um elevado grau de proliferação celular a nível epitelial e do estroma no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, em comparação com mulheres saudáveis [6], o que vai ao encontro dos resultados de Johnson MC *et al* [23], que verificou que a proliferação celular do epitélio e do estroma endometriais na fase proliferativa e fase secretora precoce e média de mulheres com EDM era superior à detectada no endométrio proliferativo normal [23]. Estes resultados demonstram que, além de existir uma resistência à apoptose, há também um aumento da proliferação celular, o que vai promover ainda mais a sobrevivência e o crescimento dos implantes de EDM.

Estas alterações justificam a razão pela qual as células endometriais têm uma capacidade adicional de proliferar e de resistir à apoptose, o que, associado a factores imunohistoquímicos presentes na cavidade peritoneal, faz com que estas células se implantem e cresçam fora da cavidade uterina, dando origem à endometriose.

## **5. O CA-125 como biomarcador da endometriose**

O método *gold standard* para o diagnóstico da EDM é a laparoscopia [2,7]. No entanto, apesar de permitir a identificação macroscópica e histológica das lesões características da endometriose, a cirurgia acarreta diversos riscos, como por exemplo a formação de aderências, a perfuração intestinal e a ocorrência de lesões vasculares [26], não evitando a ocorrência de elevadas taxas de recidivas dos implantes e, conseqüentemente, da sintomatologia dolorosa. Deste modo, parte das doentes iniciam o tratamento hormonal empiricamente, partindo de um diagnóstico de presunção, elaborado tendo em consideração a história clínica, o exame objectivo e a ecografia transvaginal [9].

O diagnóstico de endometriomas com a ecografia transvaginal é de elevada sensibilidade e especificidade [18,27]. No entanto, os implantes peritoneais, principalmente os associados a EDM em estadios iniciais, carecem ainda de métodos imagiológicos ou analíticos que permitam o diagnóstico definitivo [18,27].

Idealmente, a existência de um biomarcador com elevada sensibilidade e especificidade, associado a métodos não invasivos, permitiria o diagnóstico definitivo sem a

necessidade de realização da laparoscopia, permitindo assim que a maior parte das mulheres com EDM fossem tratadas medicamente sem a necessidade de recorrerem à cirurgia para a confirmação da doença, evitando a exposição a riscos desnecessários, melhorando a sua qualidade de vida e, reduzindo também, os custos com a EDM.

O biomarcador mais estudado até ao momento é o CA-125, uma glicoproteína de elevado peso molecular (>20.000 Da), que no adulto pode ser encontrada no epitélio normal ou neoplásico de origem celómico, como o do endométrio, do endocolo, das trompas de Falópio e do ovário [28]. Este biomarcador tem sido usado na detecção e na monitorização da endometriose [27]. Os níveis séricos mais elevados observados em mulheres com EDM devem-se ao facto de este biomarcador se encontrar em concentrações mais elevadas nos implantes ectópicos e às reacções inflamatórias associadas a esta doença na cavidade peritoneal, o que altera a permeabilidade endotelial que, conseqüentemente, permite a existência de níveis mais elevados em circulação [28,29]. Além disso, a sua elevação em mulheres sem e com EDM durante a menstruação [30,31], vem ao encontro da etiologia principal proposta para esta patologia, a menstruação retrógrada.

Kitawaki J *et al* [27] avaliou o valor diagnóstico do CA-125 na endometriose na ausência de endometriomas. Dado que a presença de endometriomas aparentemente está associada principalmente a casos de EDM avançada (estadio III e IV), uma vez que no grupo de estudo com endometriomas cerca de 95.0% das mulheres se encontravam nestes estadios, comparativamente com o grupo sem endometriomas, onde as mulheres com EDM ligeira (estadio I e II) constituíam 84.0% dos casos, este estudo procurou determinar um *cut-off* para a endometriose ligeira, sem endometriomas. A existência de dois valores permite um valor preditivo positivo de 92.9% nos casos com CA-125 igual ou superior a 30 U/mL, e um valor preditivo negativo de 78.0% nos casos com CA-125 inferior a 20 U/mL, sendo que os valores que se encontram entre 20 e 30 U/mL apresentaram um valor diagnóstico limitado, uma vez

que o produto entre a sensibilidade e a especificidade foi o mais baixo encontrado (comparativamente com os produtos obtidos para os valores de CA-125 de 20 e 30 U/mL). Os valores obtidos nos casos associados a endometriomas demonstraram um desempenho diagnóstico maior, como seria de esperar, uma vez que foi demonstrado que os níveis de CA-125 aumentam com o grau de endometriose, à semelhança do que foi encontrado no estudo de Cheng YM *et al* [32]. No entanto, valores abaixo de 20 U/ml não excluíram a presença de endometriose em cerca de 10.6% dos casos de EDM associada a endometriomas, limitando ainda mais o CA-125 quanto ao seu valor diagnóstico. Os resultados obtidos têm relevância, uma vez que foi usada uma amostra extensa (n=775), sem tratamento hormonal prévio que pudesse adulterar os resultados obtidos [27].

Os resultados obtidos por Barbosa CP *et al* [4] vêm suportar as limitações do CA-125, uma vez que nas mulheres diagnosticadas histologicamente com EDM no estadio I e II foi obtido um valor médio de CA-125 sérico de 26.9, enquanto que nas mulheres sem EDM foi obtido um valor médio de 28.3 U/mL. Estes resultados vêm sustentar o valor diagnóstico limitado do CA-125, particularmente entre os valores de 20 e 30 U/mL, à semelhança do concluído por Kitawaki J *et al* [27]. Dois factores poderiam justificar a ausência da elevação nestes casos de EDM, uma vez que os casos diagnosticados eram de EDM nos estadios I e II e, portanto, associados a elevações mais ténues dos níveis de CA-125, e ao facto da amostra estudada ser muito reduzida (n=80).

Na tentativa de avaliar o valor diagnóstico do CA-125 no sangue e no fluido peritoneal, Szubert M *et al* [31] apresentou um valor médio de CA-125 sérico no grupo diagnosticado com EDM de 33.98 U/mL, enquanto que o grupo de controlo apresentou 9.3 U/mL, observando-se a mesma relação no fluido endometrial, mas com valores mais elevados (2640.23 e 1241.88 U/mL, respectivamente). No entanto, o CA-125 foi considerado apenas como um preditor moderado para o diagnóstico de EDM, estando associada a uma

sensibilidade de 68.29%, uma especificidade de 66.67%, um valor preditivo positivo de 84.85% e um valor preditivo negativo de 43.48%, para um *cut-off* de 11 U/mL. Estes resultados poderão ser justificados pelo *cut-off* estudado, que foi de apenas 11 U/mL, o que poderá ter levado a que muitas doentes não obtivessem um resultado positivo, principalmente se a maior parte do grupo de estudo se encontrasse em estadios iniciais de EDM, uma vez que, à semelhança do que foi referido anteriormente, também neste estudo se verificou uma correlação significativa entre o estadio de EDM e as concentrações de CA-125 séricas. Uma vez que o objectivo do estudo seria avaliar um marcador para o diagnóstico não invasivo de EDM, não parece fazer sentido uma avaliação do fluido peritoneal, uma vez que para a sua obtenção, ter-se-ia que recorrer, evidentemente, a técnicas invasivas.

No estudo conduzido por Socolov R *et al* [33] foram seleccionados e avaliados potenciais biomarcadores para a EDM. Apenas os valores séricos de CA-125 e de IL-9 estavam elevados nas doentes com EDM, com um valor médio de 67.5 U/mL e de 11.83 pg/ml, respectivamente. Para um valor limite de 35 U/ml, o CA-125 identificou 54% das mulheres com EDM, apresentando uma especificidade de 91%, e o IL-6, para um valor limite de 2 pg/ml, apresentou uma especificidade muito baixa, de 12%. No entanto, o número de casos estudados foi muito reduzido (n=48), sendo de interpretar os valores de sensibilidade e especificidade com alguma reserva. Mesmo que estes resultados tivessem sido obtidos numa amostra mais alargada, o CA-125 não apresentaria um valor diagnóstico estatisticamente significativo.

Além das limitações encontradas nestes artigos, o facto de o CA-125 poder estar elevado noutras situações, como na peritonite, na ascite, nos quistos ováricos, na insuficiência cardíaca e na pancreatite, além de outras [31], contribui ainda mais para a sua fraca especificidade como elemento diagnóstico da endometriose, apresentando globalmente uma

sensibilidade e especificidade insuficiente para que, em conjunto com outros métodos não invasivos, possa permitir o diagnóstico com elevada precisão de endometriose.

Conhecidas as limitações do valor diagnóstico do CA-125 isoladamente, procurou-se associar este biomarcador a outros, para que em conjunto, pudessem atingir o objectivo inicialmente proposto para o CA-125, ou seja, o atingimento de um valor diagnóstico estatisticamente significativo que permitisse, em associação com outros métodos não invasivos (como a ecografia transvaginal), o diagnóstico de EDM sem a necessidade de recorrer à laparoscopia.

O CCR1, um membro da família dos receptores acoplados à proteína G, tem a sua expressão aumentada nos macrófagos peritoneais e nos leucócitos séricos em mulheres com EDM [8]. A sua associação com a proteína quimiotáctica dos monócitos (MCP-1), que participa na activação de células inflamatórias, e com o CA-125, foi estudada por Agic A *et al* [8], tendo atingido uma sensibilidade de 92.2%, uma especificidade de 81.6%, com um valor preditivo negativo de 83.3%. Este método poderá ter utilidade na prática clínica, uma vez que foi testado numa amostra relativamente grande (n=162) que não tinha recebido terapêutica hormonal prévia que pudesse enviesar os resultados. Além disso, a sensibilidade no estadio I também foi elevada (86.96%), o que poderá ser útil na detecção dos estadios mais precoces de EDM. Possivelmente este valor de sensibilidade nestes casos está relacionado com o uso da MCP-1, cuja elevação foi demonstrada em mulheres com EDM, principalmente nos estadios iniciais de doença [8].

A possibilidade de diagnosticar a EDM utilizando o CA-125 em associação com o CA 19.9, uma glicoproteína expressada pelo tecido endometrial, e com a Interleucina 6 (IL-6), que está envolvida na patofisiologia da EDM, foi estudada por Somigliana E *et al* [18], que concluiu que, nem o CA 19.9 nem a IL6, isoladamente ou em associação com o CA-125,

possuem um valor diagnóstico significativo, independentemente do estadió, não adicionando nenhuma informação em comparação com o uso isolado de CA-125, que por si só apenas atingiu uma sensibilidade de 27% (e especificidade de 97%). Este resultado difere do concluído por Harada T *et al* [34], que apresentou uma especificidade de 100% para o CA 19.9, defendendo que este marcador poderia ser útil para o diagnóstico das formas mais severas da EDM, uma vez que todas as mulheres que apresentaram a elevação do CA 19.9 encontravam-se nos estadios III e IV. Estas discrepâncias podem dever-se ao facto da população estudada ser reduzida (n=45 e n=101, respectivamente), o que adicionado ao método de selecção das doentes, que no estudo de Somigliana E *et al* [18] incluiu doentes com quistos ováricos não endometriais e com doença inflamatória pélvica, poderá ter reduzido a especificidade dos biomarcadores avaliados, levando a que estes resultados não sejam considerados credíveis, concluindo-se que é necessária a realização de mais estudos que incluam o CA 19.9.

Outro biomarcador foi avaliado sem sucesso, o CD-23, que falhou na distinção entre mulheres com EDM e mulheres saudáveis, ao contrário do CA-125, que confirmou o seu potencial como biomarcador auxiliar na EDM, uma vez que a sua concentração média era significativamente mais elevada no grupo de estudo em comparação com os controlos [35]. Este estudo foi realizado numa população pequena (n=102), com poucas amostras por grupo, o que poderá ter limitado os seus resultados relativamente ao CD-23.

No estudo conduzido por Mihalyi A *et al* [36], foi avaliado o desempenho diagnóstico de 6 biomarcadores. Três deles (IL-6, IL-8 e o CA-125) estavam elevados em todas as mulheres com EDM, atingindo, através de análise estatística avançada, uma sensibilidade de 94% e especificidade de 61%, durante a fase secretora do ciclo menstrual, no diagnóstico de mulheres com EDM mínima a ligeira. Na EDM moderada a severa (onde se observou também a elevação da PCR de elevada sensibilidade), o diagnóstico foi obtido com 100% de

sensibilidade e 84% de especificidade. A população estudada era alargada (n=294), bem definida, tendo sido excluídas doentes previamente sob medicação hormonal e que sofriam de outra patologia inflamatória pélvica, o que proporciona validade aos resultados obtidos. Deste modo, este painel poderá servir para que nenhuma mulher, independentemente do estadió de EDM, deixe de ser diagnosticada (sensibilidade elevada no diagnóstico de EDM mínima e ligeira), permitindo o seu tratamento em tempo útil e evitando a progressão da doença.

Mabrouk M *et al* [26] obteve uma sensibilidade de 87% com a combinação do CA-125, do CA 19-9 e com a survivina, tendo-se considerado essa associação suficiente para a discriminação de casos de EDM. No entanto, sendo a survivina um inibidor da apoptose, é questionável a razão pela qual os níveis séricos do seu mRNA estavam diminuídos no grupo de estudo, comparativamente com os controlos, uma vez que a EDM está associada, efectivamente, a uma inibição da apoptose.

Recentemente, na tentativa de melhorar a especificidade de um conjunto de biomarcadores para o diagnóstico de EDM, Moore RG *et al* [37] avaliou a proteína do epidídimo humano 4 (HE4) em 1042 mulheres, que é expressada nos carcinomas ováricos epiteliais. O facto de o CA-125 estar também elevado nestes carcinomas, diminui a sua especificidade na EDM. Deste modo, uma vez que a HE4 apenas se elevou em 3% das mulheres com EDM, a sua associação com o CA-125, que está elevado em 67% das doentes (para um valor limite de 35 U/ml), vai permitir uma melhoria na especificidade do diagnóstico de EDM, podendo-se associar no futuro estes dois biomarcadores a outros que permitam, em conjunto, melhorar o desempenho diagnóstico analítico da EDM.

## **6. Efeitos no ambiente subcelular e nos níveis de CA-125 com o tratamento hormonal**

### **6.1. Evolução com os estroprogestativos orais**

Os estroprogestativos têm sido largamente utilizados na terapêutica da EDM. O mecanismo de acção principal consiste na inibição da ovulação e do desenvolvimento folicular, por mecanismos de retrocontrolo negativo a nível hipofisário, do qual resulta uma diminuição dos níveis das hormonas FSH (*follicle-stimulating hormone*) e LH (*luteinizing hormone*) [38]. O uso de estroprogestativos, além de induzir uma diminuição da função ovárica, e como tal, uma diminuição dos níveis de estradiol e de progesterona, que se mantêm suprimidos e estáveis ao longo de todo o ciclo, tem também efeitos a nível do endométrio, suprimindo a proliferação endometrial, o que leva progressivamente à sua atrofia [3,38,39]. O uso em regime contínuo, ao inibir a menstruação e ao reduzir os níveis séricos de estradiol, contribui para que os implantes ectópicos de endométrio não proliferem, levando à sua atrofia [6,13].

A dismenorreia, a dispareunia e a dor pélvica diminuem eficazmente com a instituição do tratamento contínuo com estroprogestativos [7,11,12,13], promovendo a recuperação da qualidade de vida, muitas vezes afectada nas mulheres que sofrem desta patologia [12,13]. A laparoscopia, que já foi considerada a terapêutica de eleição da EDM [13,14], está associada a elevadas taxas de recorrência dos sintomas (20-40%), elevado risco de recorrência dos endometriomas (10-30%) [39], e altas taxas de persistência dos implantes [13,14], sendo assim ultrapassada nos casos ligeiros a moderados de EDM pelos estroprogestativos

administrados continuamente. A associação da sua segurança, comodidade e eficácia, faz com que constituam o tratamento de primeira linha da EDM [39].

Os estroprogestativos actuam também a nível molecular, suprimindo a proliferação celular e induzindo a apoptose em mulheres com EDM. No estudo de Meresman GF *et al* [6], foi avaliado o efeito dos estroprogestativos administrados durante 30 dias no endométrio eutópico de mulheres com EDM, nomeadamente o efeito na expressão da apoptose, da proliferação celular e nos níveis de Bcl-2 e de Bax. A apoptose atingiu níveis mais elevados depois do tratamento com estroprogestativos durante 30 dias, tanto a nível epitelial como a nível do estroma ( $0.9 \pm 0.3$ , antes do tratamento, para  $2.5 \pm 0.7$  após os 30 dias de tratamento e  $7.6 \pm 3.1$  para  $13.6 \pm 4.1$ , respectivamente). A expressão de Ki-67, usada como marcador da proliferação celular, diminuiu significativamente após o tratamento, evoluindo de índices de  $10.2 \pm 4.3$  para  $3.0 \pm 1$ , a nível epitelial, e de  $20.2 \pm 6.4$  para  $9.2 \pm 2.3$ , a nível do estroma. Observou-se uma diminuição da expressão de Bcl-2 e um aumento significativo da expressão de Bax, após a administração dos estroprogestativos. Estas alterações correlacionam-se com a atrofia endometrial observada histologicamente.

As alterações observadas nos níveis de Bcl-2 e de Bax justificam o aumento da apoptose, após o tratamento com estroprogestativos durante o período de apenas 30 dias, devido à diminuição dos níveis do proto-oncogene (Bcl-2) e ao aumento dos níveis do seu antagonista (Bax). Deste modo, poder-se-á propor que os estroprogestativos, além das alterações que efectuam a nível do endométrio de mulheres saudáveis, nomeadamente a diminuição da sua espessura devido à atrofia progressiva, poderão também actuar a nível do tecido ectópico induzindo as mesmas alterações, uma vez que os implantes têm, de acordo com a teoria mais aceite, origem no endométrio eutópico. Estes mecanismos subcelulares, aliados à supressão hormonal já conhecida dos estroprogestativos, poderão justificar a estabilização dos implantes durante a administração de regimes contínuos. O aumento da

apoptose e a diminuição da proliferação celular poderá levar à atrofia das lesões endometriais, o que justifica a melhoria sintomática das mulheres com EDM com a instituição deste tratamento.

Segundo Maia H Jr *et al* [40], que avaliou a expressão do marcador da proliferação celular, o Ki-67, e do Bcl-2 nos implantes ectópicos de endometriose interna (adenomiose), a percentagem de expressão de Ki-67 está significativamente diminuída ( $2 \pm 1.5\%$ ) após o tratamento com estroprogestativos durante pelo menos 2 meses, em comparação com os níveis atingidos por mulheres sem tratamento prévio à data da ressecção endometrial por histeroscopia e que se encontravam na fase proliferativa tardia ( $48 \pm 23\%$ ), altura em que a expressão de Bcl-2 e de Ki-67 foi mais significativa. Os níveis de Bcl-2 não apresentaram uma alteração significativa (86%), quando comparados com os níveis observados em mulheres sem tratamento prévio para a adenomiose e que se encontravam na mesma fase usada na comparação anterior (84%).

Apesar da eficácia na redução da expressão de Ki-67, a incapacidade de actuação dos estroprogestativos nos níveis de Bcl-2 na adenomiose não é esperada, uma vez que estes fármacos promovem a atrofia do endométrio em mulheres saudáveis e em doentes com EDM, e o substrato etiológico da adenomiose e da EDM é comum. Leyendecker G *et al* [41] demonstrou que as lesões de EDM e de adenomiose resultam da deslocação da camada basal do endométrio, dado que os dois tipos de lesões mimetizam os parâmetros imunohistoquímicos da camada basal do endométrio durante o ciclo menstrual. No mesmo artigo foi ainda concluído que o sangue menstrual de mulheres com EDM apresentava mais fragmentos de descamação da camada basal de endométrio comparativamente com as mulheres saudáveis, o que reforça a origem endometrial, mais especificamente na camada basal, dos implantes de endometriose. As razões para as diferenças nos resultados obtidos por Meresman GF *et al* [6] e por Maia H Jr *et al* [40] com o tratamento com estroprogestativos na

EDM e na adenomiose, relativamente aos níveis de Bcl-2, não são conhecidas, mas poderão ser justificadas por diferenças anatómicas ou no ambiente inflamatório dos locais onde se encontram as lesões, por diferenças nos níveis de receptores hormonais nos implantes ectópicos, ou mesmo pela subjectividade da observação da expressão de Bcl-2. No entanto, esta incapacidade de redução dos níveis de Bcl-2 pode explicar a ineficácia dos estroprogestativos orais no controlo da adenomiose.

Fica por esclarecer se estas alterações a nível subcelular são causadas indirectamente pela diminuição dos níveis das hormonas ováricas, ou se poderá haver algum efeito directo dos estroprogestativos a nível endometrial. Deste modo, Minami T *et al* [42] investigou os efeitos na apoptose e na proliferação celular da noretindrona, um progestativo sintético. Concluiu-se que a noretindrona inibe a proliferação *in vitro* de células do estroma endometrial, obtendo-se um efeito igual mesmo na presença de  $17\beta$ -estradiol. Este resultado corrobora a hipótese de que os estrogénios, apesar de promoverem a proliferação endometrial, contribuem para o efeito antiproliferativo dos progestativos, possivelmente devido ao facto de aumentarem a expressão dos receptores de progesterona. Verificou-se ainda que, isoladamente, a noretindrona induz a apoptose, aumentando a actividade das caspases 3/7, que desempenham um papel central na cascata da apoptose. Estes resultados sugerem que os estroprogestativos podem suprimir os implantes de endometriose, actuando de um modo directo nos tecidos ectópicos.

Relativamente à evolução dos níveis de CA-125 com a instituição do tratamento com os estroprogestativos na endometriose, nenhum artigo foi encontrado, de acordo com a pesquisa efectuada. Apenas o artigo de Skates SJ *et al* [43] fez referência à sua diminuição em mulheres sem endometriose, atingindo valores cerca de 26% mais baixos em mulheres

utilizadoras de estroprogestativos orais comparativamente às não utilizadoras. No entanto, o propósito da pesquisa efectuada era avaliar os níveis de CA-125 com os estroprogestativos orais no tratamento da EDM, ficando este objectivo por cumprir.

## **6.2. Evolução com os análogos da GnRH**

Os análogos da GnRH provocam inicialmente um aumento dos estrogénios circulantes, seguido de uma dessensibilização dos receptores de GnRH na hipófise, o que vai levar a uma diminuição dos níveis de gonadotrofinas e de hormonas ováricas, resultando na indução de um estado de hipoestrogenismo [39]. Uma vez que a endometriose é uma doença estrogénio-dependente, a menopausa reversível induzida pelos análogos da GnRH vai levar a uma regressão dos implantes [44,45]. No entanto, esta opção terapêutica deve reservar-se para doentes com endometriose resistente ao tratamento com estroprogestativos orais, devido aos seus efeitos secundários, como os sintomas vasomotores, a atrofia vaginal, a diminuição da libido e, fundamentalmente, a perda de densidade mineral óssea [46]. Várias estratégias têm sido propostas para contrariar estes efeitos adversos, como o uso de agentes adjuvantes, nomeadamente doses baixas de estrogénios e/ou de progesterona [47], ou a diminuição da dose após um período de indução da dessensibilização [47].

Os análogos da GnRH conseguem aumentar significativamente a taxa de apoptose espontânea *in vitro* nas células endometriais de doentes com endometriose, tanto nas amostras de tecido eutópico como de tecido ectópico, parecendo recuperar os níveis atingidos pelo

grupo de controlo (mulheres saudáveis), que não apresentou variações com o tratamento com os agonistas [15].

Este resultado vem corroborar as suspeitas de que os análogos da GnRH exercem, também, uma acção directa no endométrio, na medida em que este estudo foi realizado *in vitro* (sem possíveis efeitos de uma interacção hipofisária), e uma vez que a GnRh e o seu receptor já foram isolados em endométrio eutópico e ectópico [15,44]. Imai A *et al* [15] vem ainda confirmar a diminuição da apoptose em mulheres com endometriose e que o tratamento com os análogos da GnRH durante apenas 30 horas, *in vitro*, permite uma redução de 40% na contagem celular nas amostras de endométrio eutópico e ectópico, o que demonstra a eficácia deste tratamento no aumento da apoptose. Este efeito antiproliferativo já tinha sido descrito *in vitro* e *in vivo* em células tumorais sensíveis a hormonas, nomeadamente em células do endométrio e da mama, e em leiomiomas uterinos. No entanto, não foi esclarecido o mecanismo pelo qual se induziu a apoptose, ficando por avaliar a expressão do Bcl-2/Bax e do Fas/FasL.

Segundo Meresman GF *et al* [44], a exposição ao acetato de leuprolide (análogo da GnRH) aumentou os níveis de apoptose tanto nas culturas de células epiteliais eutópicas das doentes como nas culturas do grupo de controlo, o que vem ao encontro dos resultados de outro estudo conduzido pelo mesmo autor [45], em que se verificou um aumento na percentagem de células apoptóticas e diminuição de citocinas pró-mitogénicas, como a IL-1 $\beta$  e o factor de crescimento vascular endotelial. Meresman GF *et al* [44] demonstrou ainda uma diminuição significativa do grau de proliferação celular, também nos dois grupos.

Apesar de não terem sido obtidos a partir de células ectópicas, os resultados apresentados estão em concordância com os obtidos por Imai A *et al* [15]. Tendo em conta que o endométrio de mulheres com EDM apresenta características que justificam a

sobrevivência dos implantes em localizações extra-uterinas, como a redução da apoptose e o aumento da proliferação celular, e que as lesões derivam provavelmente da camada basal do endométrio, as alterações encontradas nas amostras eutópicas poder-se-ão extrapolar para o tecido ectópico. Esta hipótese pode ser sustentada pelos resultados de Imai A *et al* [15]. Mais uma vez, a hipótese de que os análogos exercem uma acção directa antiproliferativa no endométrio é suportada.

Mais recentemente, Bilotas M *et al* [24], que estudou os efeitos deste tratamento hormonal a nível molecular, reportou que o acetato de leuprolide aumentou a apoptose nas células epiteliais endometriais em cultura, tanto de mulheres com endometriose como no grupo de controlo, sem diferença estatisticamente significativa na percentagem de células apoptóticas entre os dois grupos. A expressão de Bax nas células endometriais das doentes aumentou  $42 \pm 12\%$  comparativamente com os níveis basais, e a expressão de Bcl-2 diminuiu  $31 \pm 4\%$ , também quando comparada com os níveis basais. A expressão do FasL aumentou  $61 \pm 13\%$  após o tratamento com o acetato de leuprolide, não tendo sido detectado nenhum efeito estatisticamente relevante nas expressões do Fas.

No sentido de averiguar qual o mecanismo responsável pela apoptose, chegou-se à conclusão que tanto a via mitocondrial como a via dos receptores de morte celular são activadas pelos agonistas da GnRH. O aumento da expressão do FasL promovido pelos análogos da GnRH já foi descrito em células tumorais de cancro do ovário e cancro do endométrio [24]. Apesar do Fas não ter apresentado alterações, o aumento do FasL justifica a activação deste mecanismo de apoptose. Além disso, o Fas não apresenta alterações durante o ciclo menstrual de uma mulher saudável, mas a expressão do seu ligando aumenta durante a fase secretora e menstrual, altura em que ocorre fisiologicamente a apoptose [24]. A capacidade dos análogos da GnRH aumentarem a expressão do Bax permitiu a sua interacção

com o Bcl-2, o que resultou na inibição do seu efeito anti-apoptótico, o que justifica também o aumento da apoptose.

À semelhança do descrito para os estroprogestativos, também os análogos exercem um efeito directo nos implantes de endometriose, além do hipoestrogenismo promovido pela sua acção a nível do eixo hormonal. Estes mecanismos explicam a regressão dos implantes de endometriose e, conseqüentemente, a melhoria sintomática nas mulheres com esta patologia.

Relativamente à evolução dos níveis séricos do CA-125, vários estudos revelaram que o tratamento com os agonistas da GnRH era eficaz na redução dos valores de CA-125 em mulheres com endometriose, tendo em conta que este marcador está elevado numa percentagem significativa das doentes, sendo utilizado actualmente na monitorização desta patologia.

Segundo Kurabayashi T *et al* [16], o tratamento com nafarelin durante 24 semanas em mulheres com menos de 30 anos diminuiu os níveis de CA-125 de  $84.0 \pm 20.2$  U/mL para  $13.4 \pm 1.9$  U/mL. O uso durante 6 meses de acetato de leuprolide promoveu uma redução dos níveis de CA-125 de  $30.62 \pm 33.81$  IU/mL para  $7.49 \pm 4.85$  IU/mL em mulheres com dor pélvica secundária a endometriose confirmada por laparoscopia [20].

De acordo com Tahara M *et al* [47], que avaliou a eficácia da terapêutica com metade da dose (200 µg) de nafarelin durante 20 semanas após um período de dose máxima (400 µg) que durou 4 semanas, os níveis de CA-125 diminuíram significativamente após as 4 primeiras semanas, não apresentando tendência para aumentar durante o período em que foi reduzida a dose de naferelein.

A diminuição dos níveis de CA-125 é uma consequência do tratamento com os análogos da GnRH. Em nenhum dos três estudos acima referidos o grupo de estudo incluía mulheres que tinham realizado tratamento hormonal prévio ou que tinham patologia associada, o que confere validade à diminuição dos níveis de CA-125. Além disso, todas as doentes possuíam o diagnóstico de EDM, confirmado através da laparoscopia.

Lossi K *et al* [48] avaliou a eficácia de um regime que incluía o uso de um inibidor da aromatase diariamente durante 69 dias, associado a um análogo da GnRH (goserelin), que foi administrado no dia 1, 28 e 56 de tratamento, na redução do volume de endometriomas e nos valores séricos de CA-125. Os níveis de CA-125 foram medidos no dia 1, 28, 56 e 70. O CA-125 estava reduzido em 61% do seu valor inicial no dia 70 de tratamento. A proporção de doentes que tinham os níveis de CA-125 acima do nível do normal (>35 U/mL) antes do tratamento (dia 1) era de 85%, 55% no dia de tratamento 28, 30% no dia 56 e 25% no dia 70 [48].

Apesar da diminuição do CA-125 indicar inativação da EDM, uma vez que houve redução do volume dos endometriomas, não se pode estabelecer com segurança, neste caso, uma relação entre os níveis do biomarcador com os análogos, uma vez que o estudo combinou no tratamento um inibidor da aromatase, que foi administrado diariamente, com um análogo da GnRH, que apenas foi utilizado durante três dias.

Akira S *et al* [49] avaliou a eficácia de um regime prolongado de baixa dose de análogos da GnRH em mulheres com adenomiose, confirmada por ressonância magnética. Antes de iniciarem o tratamento, todas as mulheres apresentavam níveis de CA-125 acima do normal. Após a administração de 900µg/dia de acetato de buserelin, durante uma média de 2.7 ± 0,5 meses, os níveis de CA-125 normalizaram e mantiveram-se em níveis estáveis, mesmo após a redução da dose do análogo da GnRH.

Na adenomiose, que consiste no crescimento de tecido endometrial ectópico no miométrio de uma forma dependente de estrogénios, os níveis de CA-125 também se apresentam, evidentemente, elevados. Os análogos da GnRH, que também são eficazes no tratamento da EDM interna [49], demonstraram a sua eficácia na redução da sintomatologia dolorosa, podendo este controlo estar associado, mais uma vez, à redução dos níveis de CA-125.

Uma vez que as concentrações deste biomarcador são mais elevadas no tecido endometrial ectópico, a diminuição dos seus níveis com o tratamento com os análogos da GnRH sugere que este tratamento é eficaz na atrofia dos implantes. Além disso, a redução da inflamação pélvica promovida pela regressão da doença diminui a permeabilidade vascular, o que pode favorecer a diminuição dos níveis séricos do CA-125. Nesse sentido, é possível que níveis mais baixos de CA-125 possam indicar controlo da actividade da EDM, comprovando assim o seu valor na monitorização do tratamento da doença; ao contrário, mesmo o aumento dos valores de CA-125 poderia indicar recidiva dos implantes de EDM.

### **6.3. Evolução com o sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel**

O sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel (Mirena®) é um tratamento eficaz no controlo da menorragia associada à endometriose interna, reduzindo a espessura do endométrio, o que pode ser evidenciado por ecografia [17]. É também eficaz no manuseamento da dismenorreia e na regressão dos implantes ectópicos de endométrio [11,17,18].

Os efeitos do Mirena® foram avaliados por Maruo T *et al* [17], que analisou o endométrio na fase proliferativa precoce de mulheres com endometriose interna (adenomiose) e 3 meses após a inserção do sistema intrauterino. O estudo concluiu que a taxa de proliferação celular era menos abundante 3 meses após a inserção do Mirena®. O número de células apoptóticas era significativamente mais elevado após a inserção do que antes. A coloração imunohistoquímica do antigénio do Fas, que antes da inserção era pouco aparente, tornou-se proeminente tanto nas glândulas endometriais como no estroma 3 meses após a inserção do Mirena®. A proteína Bcl-2 foi localizada moderadamente apenas no citoplasma das glândulas endometriais antes da inserção, tornando-se pouco aparente 3 meses após a inserção do Mirena®.

À semelhança dos estroprogestativos orais, também o levonorgestrel libertado pelo sistema intrauterino promove uma inibição da proliferação celular e um aumento da apoptose. O aumento da expressão de Fas e a diminuição da presença de Bcl-2 podem fundamentar o aumento da apoptose observado após a inserção do Mirena®. Provavelmente, este mecanismo molecular é o responsável pela atrofia observada no endométrio, podendo actuar ao nível do tecido ectópico localizado no miométrio, promovendo de igual forma a sua atrofia, o que justifica o alívio sintomático das mulheres com adenomiose, uma vez que reduz a dismenorreia e as menorragias. No entanto, este mecanismo pode também ser uma consequência do efeito do levonorgestrel libertado na cavidade uterina, ou seja, pode resultar da inibição da expressão dos receptores de estrogénios e de progesterona endometriais, o que promove uma insensibilidade local aos efeitos proliferativos desenvolvidos pelos estrogénios.

Maia H Jr *et al* [40], que avaliou as alterações na expressão de Ki-67 e do Bcl-2 ao longo de ciclo menstrual de mulheres com endometriose interna, concluiu que as doentes que tinham implantado o Mirena® possuíam um número inferior de células positivas para o Ki-67, tanto no endométrio glandular eutópico como no ectópico, com valores semelhantes aos

observados durante a fase lútea tardia em mulheres com adenomiose que não tinham o sistema intrauterino. Relativamente ao Bcl-2, houve uma redução significativa do número de lesões ectópicas com positividade para o Bcl-2 na presença do Mirena®, comparativamente com os valores da fase proliferativa tardia de mulheres sem tratamento, não apresentando uma diferença estatisticamente significativa com os valores observados durante a fase lútea tardia, em mulheres sem o Mirena®.

A fase lútea tardia do endométrio de mulheres saudáveis corresponde ao período de maior apoptose (menor efeito do Bcl-2) e de menor proliferação celular. A utilização do Mirena® mimetizou este estadio do ciclo menstrual, pela diminuição da expressão do Bcl-2, promovendo a apoptose, e pela redução da proliferação celular, evidenciada pela diminuição da expressão do Ki-67. Estes resultados confirmam que as alterações no endométrio eutópico e no ectópico são similares, comprovando as bases, já referenciadas, pela qual ocorre a atrofia das lesões de adenomiose, accionada pelo sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel, o que vai promover a regressão da adenomiose e a melhoria da qualidade de vida das doentes.

Segundo Gomes MK *et al* [19], que avaliou os efeitos do Mirena® nos marcadores da proliferação celular e da apoptose em mulheres com endometriose confirmada por laparoscopia e histologia, foi demonstrada uma taxa de proliferação celular reduzida no epitélio e no estroma, tanto no endométrio como nos implantes de endometriose, após 6 meses de tratamento. A expressão de Fas aumentou significativamente apenas no epitélio glandular, tanto no endométrio eutópico como no ectópico, após o tratamento com Mirena®.

Este estudo permitiu comprovar que o Mirena exerce o seu efeito mesmo fora da cavidade uterina, uma vez que os implantes de endometriose, provavelmente, respondem ao levonorgestrel libertado na cavidade uterina. Apesar de atingir concentrações mais baixas fora do seu local normal de acção, o levonorgestrel vai desencadear uma inibição da expressão dos

receptores de estrogénio e de progesterona nas lesões de endometriose, à semelhança do que ocorre no endométrio, tendo este efeito sido demonstrado no presente estudo a nível ectópico. Deste modo, vai ser estabelecida uma insensibilidade aos efeitos proliferativos dos estrogénios, o que conduzirá à diminuição da proliferação celular e ao aumento da apoptose, neste caso através do Fas, também demonstradas neste estudo.

O mesmo efeito do Mirena® sobre a expressão de Fas foi demonstrado por Maruo T *et al* [17], que inclusive reportou a mesma alteração a nível do estroma. No entanto, apenas foram avaliadas amostras eutópicas de tecido endometrial, num grupo de estudo composto por mulheres com adenomiose.

Relativamente à evolução dos níveis de CA-125, foi concluído que o uso durante 6 meses de Mirena® promoveu a redução significativa dos valores de CA-125, de  $22.91 \pm 21.21$  IU/mL antes da inserção do sistema intrauterino, para  $12.07 \pm 11,34$  IU/L ao fim de 6 meses de tratamento, em mulheres dor pélvica secundária a endometriose confirmada por laparoscopia [20].

O grau de diminuição do CA-125 com o Mirena® é semelhante ao atingido pelo análogo da GnRH. Tendo em conta que o CA-125 é produzido principalmente nos implantes ectópicos, e uma vez que se sugere que o Mirena® exerce efeitos nos implantes de EDM, esta diminuição sugere o controlo da EDM. A utilização de um valor de referência de 18 U/ml permitiu aumentar a sensibilidade do diagnóstico de EDM em estadios mais precoces.

## 7. Endometriose: perspectivas futuras

A endometriose não tem cura! A cirurgia, que já foi considerada o tratamento mais eficaz na EDM, está associada a elevadas taxas de recorrência dos implantes e, conseqüentemente, dos sintomas (taxa de recorrência entre 40 e 50% aos 5 anos [50]). O tratamento médico, considerado ineficaz por não permitir a erradicação completa da doença, devido à recorrência do processo patológico após a sua interrupção, deve ser encarado como uma opção mais segura e mais inócua e, provavelmente, igualmente eficaz, para a endometriose. Uma vez que cirurgia partilha com o tratamento médico esta incapacidade de actuação na origem da doença, a escolha deverá recair na opção mais segura, não esquecendo também que cada caso é um caso, e que a 1ª opção terapêutica nem sempre pode ser adoptada, quer seja pela existência de contra-indicações ou pela preferência dos doentes. No entanto, esta interpretação de que ineficaz significa a recorrência da doença não toma em conta a natureza da própria doença. Não podemos considerar que o reaparecimento dos sintomas após a interrupção de um tratamento seja definido como "ineficácia" dos medicamentos, tomando por exemplos outras patologias, como a doença de Crohn ou a artrite reumatóide. Deste modo, o tratamento médico na EDM deve ser sempre o tratamento de primeira linha, e a EDM deve ser encarada como uma doença crónica, o que vai ao encontro do referido recentemente pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva: "A endometriose deve ser vista como uma doença crónica que requer um plano de gestão ao longo da vida com o objectivo de maximizar o uso do tratamento médico e evitar procedimentos cirúrgicos repetidos".

O tratamento médico na EDM engloba vários grupos farmacológicos, dos quais se destacam os estroprogestativos orais, os análogos da GnRH e o sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel (para a adenomiose), que de uma maneira geral são eficazes no

alívio dos sintomas dolorosos e na regressão dos implantes ectópicos. No entanto, os perfis de segurança de alguns fármacos limitam o tratamento a longo prazo, como no caso dos análogos da GnRH, cuja perda de densidade mineral óssea impede o tratamento por mais de 6 meses.

Relativamente à etiologia da EDM, o facto de esta se manter obscura poderá proporcionar a formação de novos fármacos. Uma possível alteração nos alvos terapêuticos poderá ser a chave para a criação de uma cura definitiva para a EDM. No entanto, este futuro promissor não estará ao nosso alcance sem que se responda primeiro às questões fulcrais que envolvem a origem desta doença. Por que razão a implantação do tecido endometrial ocorre apenas em determinadas mulheres, uma vez que a menstruação retrógrada é um processo fisiológico comum? A desregulação da apoptose e da proliferação celular poderá ajudar a explicar o processo patológico, mas será suficiente? O sistema imunitário, num organismo saudável, está responsável pela eliminação das células senescentes endometriais que refluem para fora da cavidade uterina durante a menstruação. No entanto, nesta patologia, este mecanismo aparentemente não funciona, pelo que se poderá sugerir que o sistema imunitário possa ser o local primário das alterações que estão na origem desta doença. O facto de esta patologia ser principalmente diagnosticada em mulheres que não pertencem aos estratos sociais mais baixos, favorece a sua possível relação com o sistema imunitário. Os estigmas da sociedade moderna, ou seja, o *stress*, os cuidados de saúde exagerados e, paradoxalmente, a higiene (ou o excesso desta), são factores bem conhecidos para a depressão e para o deficiente desenvolvimento do sistema imunitário. Deste modo, a EDM e a possível desregulação, ou mesmo deficiência, do sistema imunitário, parecem estar de acordo com outras doenças auto-imunes, características da população citadina e mais desenvolvida. A etiopatogenia poderá envolver ainda outro factor relacionado com o estilo de vida moderno, uma vez que, hoje em dia, as mulheres adiam cada vez mais a maternidade e evitam uma descendência numerosa, o que faz com que o número de menstruações destas mulheres seja bastante superior aos das

mulheres de gerações mais antigas, o que poderá agravar ainda mais a frequência da menstruação retrógrada e, portanto, a probabilidade de desenvolvimento desta doença.

Deste modo, a necessidade de novas opções de tratamento médico para a endometriose, mais eficazes e mais seguras, é imperativo e de importância crucial, tendo em conta a prevalência desta doença na população feminina em idade reprodutiva e atendendo à perda de qualidade de vida, por vezes muito severa, que esta patologia provoca.

O Visanne® é o único fármaco desenvolvido especificamente para o tratamento da EDM. O seu único princípio activo é o dienogest, um progestativo sintético com formulação oral que possui um forte efeito progestativo no endométrio, estando provada a sua capacidade redutora nos implantes de EDM. Este efeito pode ser explicado pelo seu mecanismo de acção, que consiste na inibição moderada da secreção de gonadotrofinas, o que leva à redução da produção de estrogénio e, conseqüente, à inibição da ovulação, diminuindo assim o efeito mitótico desta hormona no endométrio eutópico e ectópico. Além dessa via, o dienogest exerce um efeito inibidor directo sobre o tecido endometrial, à semelhança do que foi descrito anteriormente para os estroprogestativos e para os análogos da GnRH.

Este progestativo possui um perfil de segurança elevado, com actividade anti-androgénica e sem acção glucocorticóide, estando ainda associado a efeitos hipoestrogénicos mínimos, uma vez que a redução dos níveis de estradiol sérico é moderada. Esta ausência de actividade deve-se à baixa afinidade, ou mesmo inexistência de ligação, que o dienogest tem para os receptores dos estrogénios, da aldosterona e dos glucocorticóides.

Apesar de a sua comercialização ser muito recente, este fármaco passou por um extenso programa de investigação, que incluiu estudos de determinação da faixa de dosagem, estudos controlados por placebo, com comparador activo e de longo prazo. Estes estudos

concluíram que a dose óptima de eficácia e tolerância é de 2 mg, e que o dienogest é significativamente superior ao placebo no controlo da dor pélvica, dismenorreia e dispareunia associada à EDM, sendo que a comparação com o placebo oferece uma prova importante para a demonstração da eficácia de medicamentos. No estudo de comparação com um agonista da GnRH, o acetato de leuprolide, o dienogest demonstrou uma eficácia equivalente a este tratamento corrente e um perfil de segurança mais favorável, uma vez que apresentou uma taxa menor de sintomas vasomotores e não provocou alterações na densidade mineral óssea, ao contrário do que ocorreu com o agonista referido. O seu uso por um período de 15 meses revelou-se seguro, sem efeitos decorrentes do hipoestrogenismo (afrontamentos, diminuição da libido, atrofia vaginal, perda da densidade mineral óssea), nem alterações significativas do peso corporal ou dos níveis séricos de lípidos.

Foi ainda demonstrado por laparoscopia que o Visanne® é eficaz na atrofia dos implantes de EDM, permitindo a redução para estadios mais baixos de doença, havendo casos de ausência de tecido ectópico após um período de tratamento de 24 semanas.

Relativamente ao seu perfil de segurança, as reacções adversas mais frequentes foram as cefaleias (9.0%), o desconforto mamário (5.4%), o humor depressivo (5.1%) e o acne (5.1%). Uma vez que o Visanne® promove a longo prazo uma regressão do endométrio, nos primeiros meses de tratamento ocorreram ocasionalmente alterações nos parâmetros de hemorragia, como "spotting", metrorragias e amenorreia. No entanto, a frequência e intensidade destes sintomas diminuíram com o passar do tempo, como foi relatado durante o período de estudo de 15 meses.

Apesar da inibição da ovulação desencadeada pela toma diária do Visanne®, o seu efeito contraceptivo ainda não foi estudado, pelo que não se recomenda este medicamento para a prevenção da concepção.

A investigação clínica do Visanne® demonstrou que este fármaco é tão eficaz no tratamento da dor como os agonistas da GnRH, e possui um perfil de elevada segurança e tolerabilidade, o que permite um tratamento a longo prazo da endometriose [50].

## **8. Conclusão**

O ambiente subcelular na EDM apresenta alterações comparativamente com o endométrio de mulheres saudáveis. A diminuição da apoptose é uma constante nos artigos referenciados, ficando estabelecido que este é um dos factores responsáveis pela sobrevivência dos implantes de células endometriais fora da cavidade uterina. O aumento da expressão do Bcl-2 durante a fase proliferativa justifica a diminuição da apoptose, sendo proposto que nas restantes fases do ciclo menstrual a diminuição da morte celular programada seja sustentada por outros mecanismos anti-apoptóticos, como por exemplo, o sistema Fas/FasL. Relativamente ao Bax, apesar de a sua expressão estar diminuída durante a fase proliferativa, os resultados apresentados na fase secretora são divergentes, sendo necessária a realização de mais estudos que validem os resultados obtidos até à presente data. Embora não tenham sido encontrados artigos que comparassem o sistema Fas/FasL entre o endométrio normal e as células endometriais ectópicas, o aumento verificado no sangue e no fluido peritoneal de mulheres com EDM do FasL e, conseqüentemente, a hipótese do aumento da apoptose das células do sistema imunitário, que eliminariam as células senescentes endometriais, vai ao encontro do papel proposto para este sistema na etiopatogenia da EDM.

Além destas alterações na regulação da apoptose, o aumento da proliferação celular verificada parece contribuir ainda mais para o desenvolvimento dos implantes ectópicos. No entanto, estas alterações não justificam a patofisiologia na integridade, uma vez que existem diferenças entre o endométrio eutópico e os implantes ectópicos, o que sugere que existem mecanismos, possivelmente imunológicos, que actuam fora da cavidade uterina, potenciando a capacidade de implantação das células endometriais.

A avaliação do CA-125 como biomarcador isolado da EDM, possibilitando o diagnóstico desta doença em associação com outros métodos não invasivos, revelou-se negativa, principalmente para os casos de EDM ligeira. O CA-125 não atingiu um valor diagnóstico satisfatório, evidenciando uma elevada taxa de falsos negativos mesmo nos casos de EDM em estádios mais avançados, apresentando concomitantemente uma baixa especificidade para esta doença, uma vez que se pode encontrar elevado em inúmeras patologias. A associação do CA-125 com outros biomarcadores parece ser mais promissora, apresentando valores globais de sensibilidade e de especificidade mais elevados, nomeadamente a associação com o CCR1 e o MCP-1, com o IL-6 e o IL-8 e, mais recentemente, com a HE4, que permite uma melhoria significativa da especificidade do CA-125.

O tratamento hormonal exerce efeitos nas alterações descritas a nível do ambiente subcelular na EDM. Os estroprogestativos orais promovem o aumento da apoptose, a diminuição da proliferação celular e o aumento da expressão de Bax, o que contribui para a atrofia dos implantes de EDM, justificando a melhoria sintomática após a instituição de regimes contínuos destes fármacos. No entanto, os resultados relativamente ao Bcl-2 diferem entre a EDM e a adenomiose, o que pode ser justificado pelas diferenças anatómicas que podem influenciar os diferentes ambientes inflamatórios e os próprios receptores hormonais. Além disso, é sugerido ainda que estes fármacos exercem um efeito directo sobre os

implantes ectópicos, além da sua acção nos níveis das hormonas ováricas. Os análogos da GnRH exercem também um efeito directo sobre as células ectópicas, induzindo a apoptose e inibindo a proliferação celular, possivelmente através da diminuição da expressão de Bcl-2 e do aumento da expressão de Bax e de FasL, acções promovidas igualmente pelos análogos. Todos estes efeitos contribuem para a atrofia das lesões de EDM, sustentando a eficácia dos análogos no tratamento desta doença. O Mirena® promove os mesmos efeitos descritos anteriormente, relativos à apoptose e à proliferação celular, em mulheres com endometriose interna, sendo que o aumento da apoptose pode ser fundamentado pela diminuição da expressão de Bcl-2 e pelo aumento da expressão de Fas.

Os análogos da GnRH e o Mirena® são eficazes na redução dos valores de CA-125 em mulheres com EDM, sendo que esta diminuição pode indicar o controlo da doença. Deste modo, apesar do seu valor diagnóstico ser insatisfatório, o CA-125 tem demonstrado a sua utilidade na monitorização do tratamento da EDM.

O Visanne®, o único fármaco desenvolvido especificamente para o tratamento da EDM, é a mais recente aquisição no combate a esta patologia, que devido ao seu perfil de elevada segurança e tolerabilidade permite a realização de um tratamento a longo prazo. No entanto, apesar do tratamento farmacológico na EDM ser considerado eficaz e seguro, a incapacidade de actuar na etiologia desta doença, no sentido de permitir uma cura definitiva, ou seja, impedir a recorrência da doença após a suspensão do tratamento hormonal, faz com que o controlo dos sintomas seja, infelizmente, o único objectivo dos fármacos existentes actualmente. Deste modo, a investigação da etiopatogenia desta doença mantém-se um mistério e um enorme desafio científico, sendo necessário estabelecer definitivamente a sua total compreensão, para que num futuro próximo seja possível encontrar a cura definitiva para a endometriose. Paralelamente torna-se imperiosa a realização de estudos multicêntricos que

permitam validar os resultados obtidos nesta revisão, e que possibilitem esclarecer as incongruências encontradas nos mecanismos subcelulares avaliados.

Nota: Este artigo de revisão não foi redigido de acordo com o Acordo Ortográfico.

## **9. Agradecimentos**

À Senhora Professora Doutora Isabel Torgal, pela partilha de conhecimentos, disponibilidade e importante orientação ao longo da realização do trabalho.

À Senhora Professora Doutora Margarida Dias, pela motivação que me inculuiu, apoio e colaboração valiosa na realização deste trabalho.

Ao Miguel, por toda a paciência, compreensão, apoio e amor.

## 10. Referências bibliográficas

1. Chapron C, Souza S, Borghese B, et al. Oral contraceptives and endometriosis: the past use of oral contraceptives for treating severe primary dysmenorrhea is associated with endometriosis, especially deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod.* 2011; 26(8):2028-2035.
2. Davis LJ, Kennedy SS, Moore J, Prentice A. Oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2007 18;(3): CD001019
3. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod.* 2004; 10(1):29-38.
4. Barbosa CP, Souza A, Bianco B, et al. Frequency of endometriotic lesions in peritoneum samples from asymptomatic fertile women and correlation with CA125 values. *Sao Paulo Med J.* 2009; 127(6):342-5.
5. Mabrouk M, Frascà C, Geraci E, et al. Combined oral contraceptives therapy in women with posterior deep infiltrating endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2011; 18(4):470-4.
6. Meresman GF, Augé L, Barañao RI, et al. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002; 77(6):1141-7.
7. Sanfilippo JS, Hur HC. Oral contraceptives for endometriosis-associated pain. *J Minim Invasive Gynecol.* 2006; 13(6):525-7.

8. Agic A, Djalali S, Wolfler MM, et al. Combination of CCR1 mRNA, MCP1, and CA125 measurements in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis. *Reprod Sci.* 2008; 15(9):906-11.
9. Rodgers AK, Falcone T. Treatment strategies for endometriosis. *Expert Opin. Pharmacother.* 2008; 9(2):243-55.
10. Moore J, Kennedy S, Prentice A. Modern combined oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2007; 18;(3): CD001019
11. Schindler AE. Hormonal contraceptives and endometriosis/adenomyosis. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26(12):851-4.
12. Harada T, Momoeda M, Taketani Y, et al. Low-dose oral contraceptive pills for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril.* 2008; 90(5):1583-8.
13. Vercellini P, Crosignani PG, Somigliana E, et al. Medical Treatment for rectovaginal endometriosis: what is the evidence? *Hum Reprod.* 2009; 24(10): 2504-14.
14. Vercellini P, Pietropaolo G, Giorgi O, et al. Treatment of symptomatic rectovaginal endometriosis with an estrogen-progestogen combination versus low-dose norethindrone acetate. *Fertil Steril.* 2005; 84(5):1375-87.
15. Imai A, Takagi A, Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone analog repairs reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182(5):1142-6.
16. Kurabayashi T, Takakuwa K, Tanaka K, et al. Treatment with nafarelin for endometriosis in young women. *J Reprod Med.* 2000; 45(6):454-60.

17. Maruo T, Loaoag-Fernandez JB, Pakarinen P, et al. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod.* 2001; 16(10):2103-8.
18. Somigliana E, Viganò P, Tirelli AS, 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(8):1871-6.
19. Gomes MK, Rosa-e-Silva JC, Garcia SB, et al. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cell proliferation, Fas expression and steroid receptors in endometriosis lesions and normal endometrium. *Hum Reprod.* 2009; 24(11):2736-45.
20. De Sá Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, Nogueira AA, et al. The levonorgestrel-releasing intrauterin device reduces CA-125 serum levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2006; 86(3):742-4.
21. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2000; 74(4):760-6.
22. Dmowski WP, Ding J, Shen J, et al. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod.* 2001; 16(9):1802-8.
23. Johnson MC, Torres M, Alves A, et al. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: Expression of c-myc, TGF-beta I and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3:45.
24. Bilotas M, Barañao RI, Buquet R, et al. Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod.* 2007; 22(3):644-53.

25. Harada T, Taniguchi F, Izawa M, et al. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci.* 2007; 12:3140-51.
26. Mabrouk M, Elmakku A, Caramelli E, et al. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 285(5):1307-12.
27. Kitawaki J, Ishihara H, Koshiha H, et al. Usefulness and limits of CA-125 in diagnosis of endometriosis without associated ovarian endometriomas. *Hum Reprod.* 2005; 20(7):1999-2003.
28. Amaral VF, Ferriani RA, Silva de Sá MF, et al. Positive correlation between serum and peritoneal fluid CA-125 levels in women with pelvic endometriosis. *Sao Paulo Med J.* 2006; 124(4):223-7.
29. Matalliotakis IM, Goumenou AG, Mulayim N, et al. 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.* 2005; 271(1):40-5.
30. Kahraman K, Ozguven I, Gungor M, et al. Extremely elevated serum CA-125 level as a result of unruptured unilateral endometrioma: the highest value reported. *Fertil Steril.* 2007; 88(4):968.
31. Szubert M, Suzin J, Wierzbowski T, et al. CA-125 concentrations in serum and peritoneal fluid in patients with endometriosis - preliminary results. *Arch Med Sci.* 2012; 8(3):504-8.
32. Cheng YM, Wang ST, Chou CY. Serum CA-125 in preoperative patients at high risk for endometriosis. *Obstet Gynecol.* 2002; 99(3):375-80.

33. Socolov R, Butureanu S, Angioni S, et al. The value of serological markers in the diagnosis and prognostic of endometriosis: a prospective case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 154(2):215-7.
34. Harada T, Kubota T, Aso T. Usefulness of CA 19-9 versus CA125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril.* 2002; 78(4):733-9.
35. Ramos IM, Podgaec S, Abrão MS, et al. Evaluation of CA-125 and soluble CD-23 in patients with pelvic endometriosis: a case-control study. *Rev Assoc Med Bras.* 2012; 58(1):26-32.
36. Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM, et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum Reprod.* 2010; 25(3):654-64.
37. Moore RG, Miller MC, Steinhoff MM, et al. Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206(4):351.e1-8.
38. Endrikat J, Parke S, Trummer D, et al. Pituitary, ovarian and additional contraceptive effects of an estradiol-based combined oral contraceptive: results of a randomized, open-label study. *Contraception.* 2013; 87(2):227-34.
39. Hee L, Kettner LO, Vejtorp M. Continuous use of oral contraceptives: an overview of effects and side-effects. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2013; 92(2):125-36.
40. Maia H Jr, Maltez A, Studart E, et al. Effect of menstrual cycle and hormonal treatment on ki-67 and bcl-2 expression and adenomyosis. *Gynecol Endocrinol.* 2005; 20(3):127-31.
41. Leyendecker G, Herbertz M, Kunz G, et al. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod.* 2002; 17(10):2725-36.

42. Minami T, Kosugi K, Suganuma I, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of norethisterone on endometriotic stromal cells in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013; 166(1):76-80.
43. Skates SJ, Mai P, Horick NK, et al. Large prospective study of ovarian cancer screening in high-risk women: CA125 cut-point defined by menopausal status. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4(9):1401-8.
44. Meresman GF, Bilotas M, Buquet RA, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2003; 80 Suppl. 2:702-7.
45. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, et al. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1 $\beta$  and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 2003; 18(9):1767-71.
46. Kitawaki J, Ishihara H, Kiyomizu M, et al. Maintenance therapy involving a tapering dose of danazol or mid/low doses of oral contraceptives after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for endometriosis-associated pelvic pain. *Fertil Steril.* 2008; 89(6):1831-5.
47. Tahara M, Matsuoka T, Yokoi T, et al. Treatment of endometriosis with a decreasing dosage of a gonadotropin-releasing hormone agonist (nafarelin): a pilot study with low-dose agonist therapy ("draw-back" therapy). *Fertil Steril.* 2000; 73(4):799-804.
48. Lossl K, Loft A, Freiesleben NLC, et al. Combined down-regulation by aromatase inhibitor and GnRH-agonist in IVF patients with endometriosis - A pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 144(1):48-53.

49. Akira S, Mine K, Kuwabara Y, et al. Efficacy of long-term, low-dose gonadotropin-releasing hormone agonist therapy (draw-back therapy) for adenomyosis. *Med Sci Monit.* 2009; 15(1):CR1-4.

50. Bayer Schering Pharma. Visanne® Product Monograph. Germany: Bayer Schering Pharma; 2010