

## Apoptosis and cellular proliferation in endometriosis: the state of the art

### Apoptose e proliferação celular na endometriose: estado da arte

Simone Subtil\*, Isabel Torgal\*\*, Margarida Dias\*\*\*

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

#### Abstract

Endometriosis is a disease characterized by the ectopy of endometrial glands and stroma, which can significantly compromise the quality of life in childbearing-age women. Its etiology remains uncertain since retrograde menstruation does not completely explain the endometriosis implant fixation process. 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 to explain its pathogenesis. Hormonal treatment usually controls symptoms associated with this disease. Its effects include the interference with the regulation of apoptosis and cellular proliferation. The objective of this review is to highlight the main subcellular environment changes in endometriosis, referring to the factors that regulate apoptosis and cellular proliferation, and how all those factors evolve with the hormonal treatment.

**Keywords:** Endometriosis; Apoptosis; Bcl-2, Bax, Cellular proliferation.

#### 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<sup>1</sup>. 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<sup>2</sup>. É uma patologia enigmática que afecta cerca de 15% das mulheres em idade fértil<sup>3,4</sup>, cuja clínica se caracteriza por dismenorrea secundária intensa, dispareunia profunda, dor pélvica e infertilidade, levando frequentemente a uma diminuição grave da qualidade de vida<sup>2,5</sup>.

Apesar de a menstruação retrógrada ser o mecanismo etiológico mais consensual, terá que existir uma sus-

ceptibilidade genética ou imunohistoquímica<sup>2</sup>, designadamente uma desregulação da apoptose e da proliferação celular, capaz de explicar a sobrevivência dos implantes<sup>6</sup>, uma vez que o fluxo retrógrado não é exclusivo das mulheres com endometriose<sup>2</sup>.

O tratamento hormonal constitui o tratamento de primeira linha da endometriose, atingindo resultados eficazes no controlo dos sintomas e da progressão da doença. Actualmente, inclui os estroprogestativos e os progestativos orais, os análogos da GnRH e o sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel (Mirena<sup>®</sup>), para a adeniose. O tratamento hormonal promove a atrofia dos implantes ectópicos<sup>7,8</sup>, interferindo possivelmente a nível molecular, promovendo a apoptose e diminuindo a proliferação celular<sup>6,9,10</sup>.

#### 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 de 2000 e o ano de 2014, tendo sido usadas combinações das

\*Mestre em Medicina

\*\*Diretora do Serviço de Ginecologia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; Professora Auxiliar de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;

\*\*\*Assistente Hospitalar Graduada de Ginecologia do Serviço de Ginecologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; Professora Auxiliar de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

seguintes palavras-chave: «endometriose», «apoptose», «Bcl-2», «Bax», «progestativos», «Dienogest», «estrogestativos», «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.

## ALTERAÇÕES NA APOPTOSE E NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A apoptose desempenha um papel fundamental na homeostasia dos tecidos, nomeadamente durante as variações do ciclo menstrual<sup>3</sup>, estabelecendo um equilíbrio adequado com a proliferação celular, promovendo a eliminação de células senescentes da camada funcional do endométrio durante a fase secretora tardia e durante a menstruação<sup>3</sup>. Esta homeostasia está alterada na endometriose, estando descritas alterações no endométrio ectópico e eutópico que não estão presentes no endométrio normal<sup>3</sup>, designadamente uma desregulação da apoptose e da proliferação celular, que poderá explicar a extraordinária capacidade de sobrevivência dos implantes ectópicos. Estas alterações a nível do endométrio eutópico sugerem que este é o local primário do processo patológico, que culmina na EDM.

A apoptose foi quantificada em diversos estudos<sup>6,9,11,12</sup>, 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*<sup>3</sup>, que demonstraram que a percentagem de células apoptóticas no epitélio glandular do endométrio era reduzida nas pacientes com endometriose, principalmente durante a fase secretora tardia/menstruação e durante a fase proliferativa precoce, sendo esta diminuição independente do ciclo menstrual segundo Imai A *et al*<sup>9</sup>. Além disso, Dmowski WP *et al*<sup>13</sup> evidenciaram que na endometriose as variações da taxa de apoptose que ocorrem durante o ciclo menstrual são atenuadas, sendo esta diminuição encontrada nas glândulas endometriais, mas não no estroma<sup>13</sup>. Mais recentemente, Roshangar L *et al*<sup>12</sup> corroboraram a diminuição da apoptose na endometriose, não só no endométrio eutópico, mas também em amostras de tecido ectópico; Imai A *et al*<sup>9</sup> demonstraram que a apoptose estava diminuída de forma mais

acentuada nas células endometriais ectópicas, comparando com as células eutópicas de doentes com EDM. Johnson MC *et al*<sup>14</sup> verificaram que o aumento esperado de células apoptóticas durante a fase secretora tardia não ocorreu no endométrio eutópico com endometriose<sup>14</sup>.

Existe uma clara deficiência na indução da apoptose nas células endometriais de doentes com EDM, justificando a capacidade de sobrevivência aumentada destas 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 endométrio ectópico e eutópico de mulheres com EDM, nomeadamente uma diminuição da apoptose relativamente aos valores, já eles diminuídos, do endométrio eutópico, o que sugere que a desregulação da apoptose pode não ser o único mecanismo patogénico, indicando a intervenção de um ambiente alterado no fluido peritoneal, nomeadamente um ambiente local imunotolerante, permitindo o desenvolvimento dos implantes ectópicos. Esta proposta explicaria, em parte, a razão pela qual esta doença não se desenvolve em todas as mulheres, dado que a menstruação retrógrada é um processo comum.

A apoptose é controlada por duas vias: a via mitocondrial e a via do receptor de morte celular. A via mitocondrial, 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 a sobrevivência celular<sup>6</sup>. Foi evidenciado um aumento da expressão da proteína Bcl-2 no endométrio eutópico, em fase proliferativa, de doentes com endometriose comparativamente aos níveis encontrados no endométrio de mulheres saudáveis<sup>6</sup>. Segundo o mesmo autor, Meresman GF *et al*<sup>11</sup>, mas num estudo do ano 2000, no endométrio de doentes com endometriose a expressão de Bcl-2 atingiu um pico mais elevado durante a fase proliferativa tardia comparativamente com o grupo de controlo, mas desapareceu durante a fase secretora tardia, não havendo correlação significativa entre a 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*<sup>6</sup> apenas incluiu amostras de endométrio eutópico em fase proliferativa, pelo que não se poderá verificar uma concordância com os resultados apresentados pelo segundo estudo<sup>11</sup>,

que incluiu também amostras da fase secretora tardia. 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. Um erro de metodologia é de considerar, dado que a amostra estudada era muito reduzida (n=14). Todavia, a diminuição da apoptose foi constante ao longo de todo o ciclo menstrual, sendo legítimo deduzir que esta se manteve devido à acção de outros mecanismos anti-apoptóticos, tais como, 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 em mulheres saudáveis, sendo possível que esta alteração possa estar na base da diminuição da apoptose no endométrio de mulheres com EDM.

A proteína Bax antagoniza a sobrevivência induzida pelo Bcl-2. A razão Bcl-2/Bax determina a susceptibilidade aos estímulos apoptóticos; concentrações superiores de Bax promovem a apoptose<sup>6</sup>. Há uma diminuição da expressão de Bax nas amostras de endométrio eutópico em fase proliferativa na EDM<sup>6</sup>. De acordo com Johnson MC *et al*<sup>14</sup>, o mRNA do Bax aumentou 42% na fase secretora precoce e reduziu 63% na fase secretora tardia no endométrio de doentes com endometriose comparativamente ao endométrio normal. As células endometriais proliferativas na EDM 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 doentes com EDM, como no endométrio normal<sup>11</sup>.

A proteína pró-apoptótica Bax apresenta-se diminuída no endométrio proliferativo de mulheres com EDM, comparativamente com o grupo de controlo, o que, em associação com os resultados obtidos pela Bcl-2, pode explicar a diminuição da apoptose verificada na EDM. No entanto, durante a fase secretora os resultados são inconclusivos, uma vez que, apesar de Johnson MC *et al*<sup>14</sup> demonstrarem uma redução significativa na expressão de Bax durante a fase secretora tardia em mulheres com EDM, podendo explicar a redução da apoptose verificada nesta fase, evidenciou também um aumento significativo deste gene na fase secretora precoce, comparativamente com o grupo de controlo. Meresman GF *et al*<sup>11</sup> demonstraram um aumento da Bax nos dois grupos durante a fase secretora, que foi mais acentuado no grupo de controlo, sugerindo que esta proteína possa facilitar a preparação para o processo apoptótico verificado durante a menstruação em

mulheres saudáveis. Estes resultados necessitam de validação, uma vez que a diminuição da apoptose na EDM, independentemente da fase do ciclo menstrual, é uma constante em diversos estudos<sup>9,11</sup>.

O sistema Fas/FasL 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<sup>15</sup>. Até ao momento, não existe nenhum estudo comparativo da expressão do Fas ou do FasL entre os implantes de endometriose e células endometriais normais. Apenas Harada T *et al*<sup>16</sup> referenciaram que os níveis de FasL séricos e no fluido 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 a destruição 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<sup>14</sup>. 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<sup>6</sup>, o que vai ao encontro dos resultados de Johnson MC *et al*<sup>14</sup>, que verificaram 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<sup>14</sup>. 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 que as células endometriais apresentem 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.

## EVOLUÇÃO DA APOPTOSE E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM O TRATAMENTO 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*)<sup>17</sup>. O uso de estroprogestativos, além de induzir uma diminuição da função ovárica e, conseqüentemente, uma diminuição dos níveis de estradiol e de progesterona, que se mantêm suprimidos ao longo de todo o ciclo, tem também efeitos a nível do endométrio, suprimindo a proliferação endometrial, o que leva progressivamente à sua atrofia<sup>3,17,18</sup>. O uso em regime contínuo, ao inibir a menstruação e ao reduzir os níveis séricos de estradiol, conduz à atrofia dos implantes ectópicos de endométrio<sup>6,7</sup>.

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*<sup>6</sup>, 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 ainda uma diminuição da expressão de Bcl-2 e um aumento significativo da expressão de Bax, após a administração dos estroprogestativos, sendo que estas alterações se correlacionaram com a atrofia endometrial observada histologicamente.

As alterações nos níveis de Bcl-2 e de Bax justificam o aumento da apoptose, após o tratamento com estroprogestativos durante 30 dias. Deste modo, poder-se-á propor que os estroprogestativos, além das alterações que induzem a nível do endométrio normal, nomeadamente a 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 admi-

nistração de regimes contínuos.

Segundo Maia Jr H *et al*<sup>19</sup>, que avaliaram a expressão do marcador da proliferação celular e de Bcl-2 nos implantes ectópicos da adenomiose, a expressão de Ki-67 está significativamente diminuída ( $8 \pm 14\%$ ) 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 e que se encontravam na fase proliferativa tardia ( $48 \pm 23\%$ ), fase 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 (84%).

Apesar da eficácia na redução da expressão de Ki-67, a incapacidade de actuação dos estroprogestativos nos níveis de Bcl-2 na adenomiose foi inesperada, dado que estes fármacos promovem a atrofia do endométrio em mulheres saudáveis e em doentes com EDM, e o mecanismo etiológico da adenomiose e da EDM é comum. Leyendecker G *et al*<sup>20</sup> demonstraram 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. Estes autores concluíram também que o sangue menstrual na 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*<sup>6</sup> e por Maia H Jr *et al*<sup>19</sup> com o tratamento com estroprogestativos na EDM e na adenomiose, relativamente aos níveis de Bcl-2, não são conhecidas, mas poderão ser explicadas 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. 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 existirá algum efeito directo dos estroprogestativos a nível endometrial. Deste modo, Minami T *et al*<sup>21</sup> investigaram 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 o mesmo efeito na presença de 17-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.

### EVOLUÇÃO DA APOPTOSE E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM O TRATAMENTO 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, conduzindo a uma diminuição dos níveis de gonadotrofinas e de hormonas ováricas, resultando na indução de um estado de hipoestrogenismo<sup>9</sup>. Uma vez que a endometriose é uma doença estrogénio-dependente, a menopausa química induzida pelos análogos da GnRH resulta numa regressão dos implantes<sup>22,23</sup>.

Os análogos da GnRH conseguem aumentar significativamente a taxa de apoptose espontânea *in vitro* nas células endometriais da EDM, tanto nas amostras de tecido eutópico como de tecido ectópico, parecendo recuperar os níveis atingidos pelo grupo de controlo, que não apresentou variações com o tratamento com os agonistas<sup>9</sup>. Dois estudos recentes de Huang F *et al*<sup>24,25</sup>, que utilizaram a GnRH II, vêm confirmar este resultado: no primeiro<sup>24</sup>, demonstraram que a GnRH II induz a apoptose, *in vitro*, de células eutópicas e ectópicas de doentes com endometriose, sendo este efeito ainda mais marcado no tecido ectópico; no segundo<sup>25</sup>, além de apresentarem as mesmas conclusões, demonstraram ainda uma diminuição da proliferação celular, tanto a nível eutópico como a nível ectópico, sendo esta diminuição mais marcada a nível ectópico.

Imai A *et al*<sup>9</sup> confirmaram 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, evidenciando a eficácia deste tratamento no aumento da apoptose. No entanto, não está esclarecido o mecanismo responsável pela indução da apoptose, ficando por avaliar a expressão de Bcl-2/Bax e do Fas/FasL.

Segundo Meresman GF *et al*<sup>22</sup>, 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<sup>23</sup>, em que se verificou um aumento na percentagem de células apoptóticas e diminuição de citocinas pró-mitogénicas, como a IL-1 e o factor de crescimento vascular endotelial. Meresman GF *et al*<sup>22</sup> demonstraram ainda uma diminuição significativa do grau de proliferação celular, também nos dois grupos.

Apesar de não terem sido obtidos a partir de células ectópicas, estes resultados estão em concordância com os obtidos por Imai A *et al*<sup>9</sup>. Dado que o endométrio de doentes 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*<sup>9</sup>, suportando a hipótese de que os análogos exercem uma acção directa antiproliferativa no endométrio.

Mais recentemente, Bilotas M *et al*<sup>15</sup>, que estudaram os efeitos deste tratamento hormonal a nível molecular, reportaram que o acetato de leuprolide aumentou a apoptose nas células epiteliais endometriais em cultura, tanto de doentes 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, concluiu-se que tanto a via mitocondrial como a via dos receptores de morte celular são activadas pelos agonistas da GnRH. O aumento da ex-

pressão do FasL promovido pelos análogos da GnRH já foi descrito em células tumorais de cancro do ovário e cancro do endométrio<sup>15</sup>. 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<sup>15</sup>. A capacidade dos análogos da GnRH aumentarem a expressão da Bax permitiu a sua interacção com a Bcl-2, resultando na inibição do seu efeito anti-apoptótico.

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 consequente melhoria sintomática destas doentes.

## EVOLUÇÃO DA APOPTOSE E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM O TRATAMENTO COM O MIRENA®

O sistema intrauterino de libertação de levonorgestrel (Mirena®) é um tratamento eficaz no controlo da menorragia associada à adenomiose, sendo também eficaz no controlo da dismenorreia e na regressão dos implantes ectópicos de endométrio<sup>8,10,19</sup>.

Os efeitos do Mirena® foram avaliados por Maruo T *et al*<sup>10</sup>, que analisaram o endométrio na fase proliferativa precoce de mulheres com adenomiose antes e após (3 meses) a inserção do sistema intra-uterino, tendo-se concluído que a taxa de proliferação celular era menor 3 meses após a inserção do Mirena®. O número de células apoptóticas era significativamente mais elevado após a inserção. A coloração imunohistoquímica do antigénio do Fas, que antes da inserção era pouco aparente, tornou-se evidente tanto nas glândulas endometriais como no estroma 3 meses após a inserção do Mirena®. A proteína Bcl-2 foi localizada moderadamente 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 fundamen-

tar o aumento da apoptose observado após a inserção do Mirena®. Provavelmente, este mecanismo molecular é o responsável pela atrofia do endométrio, promovendo a atrofia do tecido ectópico no miométrio, explicando o alívio sintomático das mulheres com adenomiose. No entanto, este mecanismo pode também ser 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, conduzindo a uma insensibilidade local aos efeitos proliferativos dos estrogénios.

Maia Jr H *et al*<sup>19</sup>, que avaliaram as alterações na expressão de Ki-67 e da Bcl-2 ao longo de ciclo menstrual de mulheres com adenomiose, concluíram que as doentes portadoras de Mirena® apresentavam um número inferior de células positivas para o Ki-67, tanto no endométrio glandular eutópico como no ectópico, com valores sobreponíveis aos da fase lútea tardia em mulheres com adenomiose não portadoras do sistema intrauterino. Relativamente à Bcl-2, houve uma redução significativa do número de lesões ectópicas com positividade para esta proteína 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 da Bcl-2) e de menor proliferação celular. A utilização do Mirena® mimetizou este estadió do ciclo menstrual, pela diminuição da expressão da 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, pelas quais ocorre a atrofia das lesões de adenomiose, accionada pelo Mirena, promovendo a regressão da adenomiose e a melhoria da qualidade de vida das doentes.

Segundo Gomes MK *et al*<sup>26</sup>, que avaliaram 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 parece indicar que o Mirena® exerce o seu efeito também fora da 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 a nível ectópico<sup>26</sup>. Deste modo, é estabelecida uma insensibilidade aos efeitos proliferativos dos estrogénios, conduzindo à diminuição da proliferação celular e ao aumento da apoptose, neste caso através do Fas, igualmente evidenciadas neste estudo.

O mesmo efeito do Mirena® sobre a expressão de Fas foi demonstrado por Maruo T *et al*<sup>10</sup>, que reportaram idêntica acção a nível do estroma. No entanto, apenas foram avaliadas amostras eutópicas de tecido endometrial, em doentes com adenomiose.

### **EVOLUÇÃO DA APOPTOSE E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR COM O TRATAMENTO COM OS PROGESTATIVOS ORAIS**

Os progestativos orais também são uma opção para o tratamento da EDM. O dienogest, um progestativo sintético com formulação oral, é o único fármaco desenvolvido especificamente para o tratamento da EDM. A sua capacidade redutora nos implantes de EDM está descrita, tendo sido demonstrado por laparoscopia que o dienogest é eficaz na atrofia dos implantes de EDM, permitindo a redução para estadios mais baixos de doença, estando descrita a ausência de tecido ectópico após um período de tratamento de 24 semanas. 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, diminuindo assim o efeito mitótico desta hormona no endométrio eutópico e ectópico. Além dessa via, e da supressão da ovulação, o dienogest exerce um efeito inibidor directo sobre o tecido endometrial, à semelhança do que acontece com outros progestativos e com os análogos da GnRH<sup>27</sup>.

No sentido de avaliar se os resultados a nível do tecido endometrial eram sobreponíveis aos efeitos induzidos pelos outros tratamento hormonais, Miyashita *et al*<sup>28</sup> avaliaram os níveis de apoptose e de proliferação celular em amostras de endometriomas, colhidas *in vivo*, de mulheres com EDM após o tratamento com dienogest (2 mg por dia durante uma média de 6,7 meses). Foi concluído que este tratamento promoveu

uma redução da proliferação celular, uma vez que a proporção de células positivas para o Ki-67 foi significativamente menor no grupo de estudo, comparativamente com o grupo de controlo. Relativamente à apoptose, verificou-se que, em comparação com o grupo de controlo, o grupo de doentes com EDM submetido ao tratamento com dienogest apresentava níveis superiores de morte celular.

Apesar de neste estudo não ser possível avaliar se estes efeitos se deviam directamente à presença do dienogest ou indirectamente à anovulação, conclui-se que este progestativo promove o controlo da EDM através da indução da apoptose e diminuição da proliferação celular. O facto de o estudo de Shimizu *et al*<sup>29</sup> ter sido realizado *in vitro* e ter demonstrado a redução da proliferação celular em células epiteliais de endométrio humano com a presença de dienogest, à semelhança do estudo de Minami T *et al*<sup>21</sup>, que investigou os efeitos na apoptose e na proliferação celular da noretindrona, permite concluir que os progestativos são capazes de exercer um efeito anti-proliferativo directo, permitindo assim um controlo adequado da patofisiologia da EDM.

É ainda importante referir que a investigação clínica do dienogest demonstrou que este fármaco é tão eficaz no tratamento da dor como os agonistas da GnRH<sup>30,31</sup>, o que associado a um perfil de elevada segurança e tolerabilidade, permite o tratamento prolongado da endometriose<sup>27,31</sup>.

### **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 de 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 à 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 encon-

trados 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 da importância deste 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 integralmente a patofisiologia, uma vez que existem diferenças entre o endométrio eutópico e os implantes ectópicos, sendo de considerar que mecanismos, possivelmente imunológicos, actuando fora da cavidade uterina, poderão potenciar a capacidade de implantação das células endometriais.

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. No entanto, os resultados relativamente à 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. O Mirena® promove efeitos sobreponíveis relativos à apoptose e à proliferação celular, em mulheres com adenomiose, sendo que o aumento da apoptose pode ser fundamentado pela diminuição da expressão de Bcl-2 e pelo aumento da expressão de Fas. Por fim, o novo progestativo aprovado para o tratamento da EDM, o dienogest, promove igualmente um resultado promissor na apoptose e proliferação celular em amostras de tecido ectópico de mulheres com EDM, tendo já sido verificado por laparoscopia a sua eficácia na atrofia dos implantes de EDM, o que aliado ao seu perfil de segurança e tolerabilidade, o tornam numa escolha inovadora para o tratamento a longo prazo da EDM.

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, conduz à recorrência da doença após suspensão do tratamento hormonal numa percentagem considerável de casos. Deste modo, a investigação da etiopatogenia da EDM mantém-se um enorme desafio científico, sendo necessário estabelecer definitivamente a sua total compreensão, para que num futuro próximo seja possível encontrar uma cura definitiva. 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.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chapron C, Souza C, Borghese B, Lafay-Pillet MC, Santulli P, Bijaoui G, Goffinet F, de Ziegler D. 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, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod.* 2004; 10(1):29-38.
4. Barbosa CP, Souza AM, Bianco B, Christofolini D, Bach FA, Lima GR. Frequency of endometriotic lesions in peritoneum samples from asymptomatic fertile women and correlation with CA125 values. *Sao Paulo Med J.* 2009; 127(6):342-345.
5. Mabrouk M, Frascà C, Geraci E, Montanari G, Ferrini G, Raimondo D, Alvisi S, Paradisi R, Villa G, Seracchioli R. Combined oral contraceptives therapy in women with posterior deep infiltrating endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2011; 18(4):470-474.
6. Meresman GF, Augé L, Barañao RI, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002; 77(6):1141-1147.
7. Vercellini P, Crosignani PG, Somigliana E, Berlanda N, Barbara G, Fedele L. Medical treatment for rectovaginal endometriosis: what is the evidence? *Hum Reprod.* 2009; 24(10): 2504-2514.
8. Schindler AE. Hormonal contraceptives and endometriosis/adenomyosis. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26(12):851-854.
9. 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):1142-1146.
10. Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod.* 2001; 16(10):2103-2108.



11. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2000; 74(4):760-766.
12. Roshangar L, Abdollahifard S, Majdi A, Zarrintan A, Ghasemzade A, Farzadi L, Soleimani Rad S, Soleimani Rad J. Study of ultrastructure and apoptosis in the endometrium of women with or without endometriosis. *Iran J Reprod Med*. 2013; 11(5):399-404.
13. 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(9):1802-1808.
14. Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA. 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.
15. Bilotas M, Baraño RI, Buquet R, Sueldo C, Tesone M, Meresman G. 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):644-653.
16. Harada T, Taniguchi F, Izawa M, Ohama Y, Takenaka Y, Tagashira Y, Ikeda A, Watanabe A, Iwabe T, Terakawa N. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci*. 2007; 12:3140-3151.
17. Endrikat J, Parke S, Trummer D, Serrani M, Duijkers I, Klipping C. Pituitary, ovarian and additional contraceptive effects of an estradiol-based combined oral contraceptive: results of a randomized, open-label study. *Contraception*. 2013; 87(2):227-234.
18. 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):125-136.
19. Maia Jr H, Maltez A, Studart E, Athayde C, Coutinho EM. Effect of menstrual cycle and hormonal treatment on ki-67 and bcl-2 expression and adenomyosis. *Gynecol Endocrinol*. 2005; 20(3):127-131.
20. Leyendecker G, Herbertz M, Kunz G, Mall G. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod*. 2002; 17(10):2725-2736.
21. Minami T, Kosugi K, Suganuma I, Yamanaka K, Kusuki I, Oyama T, Kitawaki J. Antiproliferative and apoptotic effects of norethisterone on endometriotic stromal cells in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013; 166(1):76-80.
22. Meresman GF, Bilotas M, Buquet RA, Baraño RI, Sueldo C, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2003; 80 Suppl. 2:702-707.
23. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baraño RI. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1 and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2003; 18(9):1767-1771.
24. Huang F, Zou Y, Wang H, Cao J, Yin T. In vitro apoptosis effects of GnRHIII on endometrial stromal cells from patients with endometriosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(8):1603-1609.
25. Huang F, Wang H, Zou Y, Liu Q, Cao J, Yin T. Effect of GnRH-II on the ESC proliferation, apoptosis and VEGF secretion in patients with endometriosis in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(11):2487-2496.
26. Gomes MK, Rosa-e-Silva JC, Garcia SB, de Sá Rosa-e-Silva AC, Turatti A, Vieira CS, Ferriani RA. 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):2736-2745.
27. Bayer Schering Pharma. Visanne® Product Monograph. Germany: Bayer Schering Pharma; 2010.
28. Miyashita M, Koga K, Takamura M, Izumi G, Nagai M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. Dienogest reduces proliferation, aromatase expression and angiogenesis, and increases apoptosis in human endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2014; 30(9):644-6448.
29. Shimizu Y, Takeuchi T, Mita S, Mizuguchi K, Kiyono T, Inoue M, Kyo S. Dienogest, a synthetic progestin, inhibits the proliferation of immortalized human endometrial epithelial cells with suppression of cyclin D1 gene expression. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15(10):693-701.
30. Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Aso T, Fukunaga M, Hagino H, Terakawa N. Dienogest is as effective as intranasal busserelin acetate for the relief of pain symptoms associated with endometriosis - a randomized, double-blind, multicenter, controlled trial. *Fertil Steril*. 2009; 91(3):675-681.
31. Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C, Faustmann T, Seitz C. Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicenter, open-label trial. *Hum Reprod*. 2010; 25(3):633-641.

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA**

Simone Subtil  
E-mail: simonefcsutil@gmail.com

**RECEBIDO EM:** 10-03-2015

**ACEITE PARA PUBLICAÇÃO:** 01-05-2015