

## Biologia della cellula endometriosica

F. MINICI<sup>1</sup>, F. TIBERI<sup>2</sup>, F. MICELI<sup>1</sup>, A. TROPEA<sup>1</sup>, M. ORLANDO<sup>1</sup>, M.F. GANGALE<sup>1</sup>, A. BOMPIANI<sup>2</sup>,  
S. CAMPO<sup>1</sup>, A. LANZONE<sup>1</sup>, R. APA<sup>1</sup>,

L'endometriosi è una malattia ginecologica benigna estrogeno-dipendente che colpisce circa il 10% delle donne in età riproduttiva, caratterizzata dalla presenza di tessuto endometriale (ghiandole e stroma) al di fuori della cavità uterina ed associata a dolore pelvico, dismenorrea ed infertilità. Secondo l'ipotesi di Sampson (1) cellule endometriali desquamate vengono trasportate verso la cavità peritoneale attraverso le tube da una mestruazione retrograda. Dopo l'adesione, le cellule endometriali proliferano e inducono una risposta infiammatoria nella cavità peritoneale. La discrepanza tra il frequente reperimento di cellule mestruali desquamate in cavità peritoneale che suggeriscono un carattere para-fisiologico del fenomeno di mestruazione retrograda e l'effettiva incidenza di endometriosi sintomatica, implica il coinvolgimento di altri fattori predisponenti nella patogenesi della malattia. Un possibile ruolo favorente è stato suggerito per i seguenti fattori: predisposizione genetica; alterazioni immunitarie permissive per l'impianto ectopico dell'endometrio e/o in grado di amplificare la risposta infiammatoria peritoneale; ambiente ormonale favorente la crescita tissutale; alterazioni anatomiche e/o discinetiche del tratto uterotubarico. Tuttavia nonostante le numerose ricerche cliniche e sperimentali, la patogenesi dell'endometriosi rimane ancora controversa, in particolare per quanto riguarda la compromissione della fertilità in pazienti con endometriosi lieve e moderata, in assenza quindi di alterazioni meccaniche del tratto riproduttivo.

Alla peculiarità della composizione del fluido peritoneale e al diverso comportamento biologico dell'endometrio eutopico delle pazienti con endometriosi, è stata fin ora imputata la responsabilità del ridotto outcome riproduttivo di queste pazienti; su tali problematiche si sono concentrati gli studi con risultati purtroppo ancora controversi.

Lo sviluppo di endometriosi presuppone che stro-

ma ed epitelio endometriale aderiscano, s'impiantino, sopravvivano e crescano su superficie ovarica e/o peritoneo. La possibilità che un tessuto vada incontro a questi fenomeni al di fuori del suo habitat deve necessariamente trovare la complicità dei fattori favorenti già citati, ma nella fisiopatologia dello sviluppo dell'endometriosi non va sottovalutato il ruolo rilevante giocato dall'endometrio eutopico.

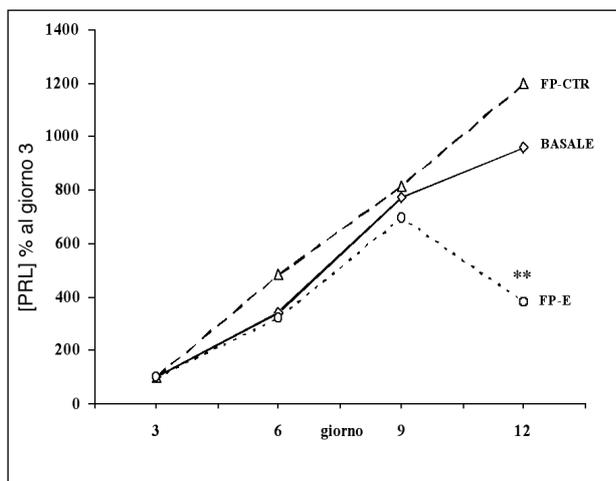
L'endometrio eutopico delle pazienti con endometriosi è caratterizzato da un'aumentata attività proliferativa ed angiogenetica (2, 3, 4, 5), e da numerosi cambiamenti immunologici e funzionali. Tra questi citiamo la presenza di anticorpi verso specifici antigeni endometriali (6), l'aumentata secrezione di IL-6 da parte delle cellule stromali (7), la marcata infiltrazione leucocitaria (8) e l'aumentata espressione della monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) che potrebbe essere coinvolta nel considerevole reclutamento di monociti e macrofagi nella cavità endometriale (9, 10). Numerose peculiarità funzionali, simili a quelle delle cellule endometriosiche, caratterizzano l'endometrio eutopico di tali pazienti. Le più rappresentative tra queste sono: la capacità di esprimere l'aromatasi, l'enzima che catalizza la produzione di estradiolo a partire dall'androgeno (11) e l'aumentata espressione di cicloossigenasi (COX)-2 con il conseguente incremento nella produzione di prostaglandine (PGs). Alcuni autori hanno suggerito che PGs ed estrogeni possano essere coinvolti in una sorta di feed-back positivo; infatti, gli estrogeni stimolano l'attività della COX-2 e la PGE2 da essa prodotta a sua volta indurrebbe l'espressione dell'aromatasi attraverso un'azione paracrina (12, 13).

Inoltre l'endometrio eutopico mostra una minore tendenza all'apoptosi spontanea e una minore suscettibilità all'apoptosi indotta dai macrofagi attivati (14, 15), nonché un differente pattern d'espressione di alcune importanti molecole di superficie quali l'integrina 3 (molecola di adesione coinvolta nell'impianto) (16) e sICAM (implicata nell'attività delle NK) (17).

Le donne con endometriosi sono caratterizzate dall'alterazione di alcuni parametri immunologici. Per quanto riguarda l'immunità cellulo-mediata, alcuni

Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma  
<sup>1</sup> Divisione di Fisiopatologia della Riproduzione Umana,  
<sup>2</sup> Istituto Scientifico Internazionale Paoli VI

© Copyright 2005, CIC Edizioni Internazionali, Roma

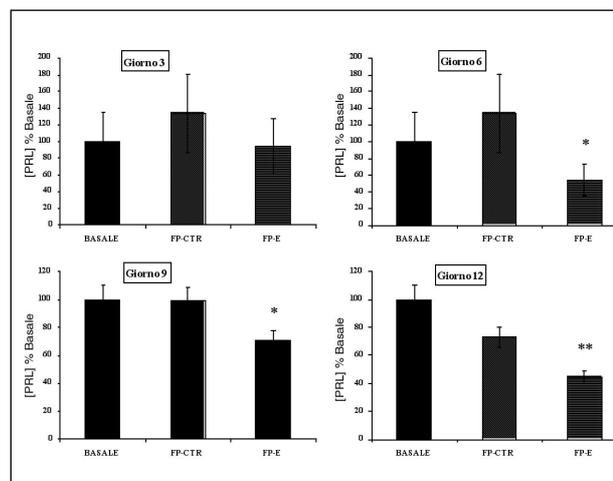


**Fig. 1 - Decidualizzazione in vitro basale (BASALE), in presenza di fluido peritoneale di pazienti con endometriosi (FP-E) e di fluido peritoneale di controllo (FP-CTR). Le concentrazioni di prolattina (PRL) sono espresse come percentuale dei valori misurati al giorno 3 ([PRL] al giorno 3 = 100%). Significatività rispetto al fluido peritoneale di controllo: \*\* p < 0,01.**

autori hanno dimostrato la presenza di un aumentato numero di macrofagi attivati e linfociti a livello peritoneale (18, 19); difetti nell'attività delle NK potrebbero essere responsabili della mancata clearance di cellule endometriali (20). Inoltre anomalie funzionali sono anche state riscontrate nella produzione anticorpale dei linfociti B (21, 22) e un incremento del rapporto tra linfociti T helper/ T suppressor è stato descritto da alcuni autori già venti anni fa (5, 23).

Il fluido peritoneale delle donne con endometriosi contiene un cospicuo numero di macrofagi attivati e di altre cellule immuni che secernono vari prodotti locali, come fattori di crescita e citochine. Un ruolo primario è stato attribuito a numerose citochine contenute nel fluido peritoneale come l'interleuchina (IL)-6, l'IL-8 e il tumor necrosis factor (TNF)-alfa, prodotte non solo dalle cellule immuni, ma anche dalle cellule endometriosiche degli espunti ectopici, sotto specifici stimoli. Le citochine sono sostanze proteiche che giocano un ruolo centrale nella regolazione di proliferazione, attivazione, chemiotassi e morfogenesi cellulare (24). Il fluido peritoneale delle pazienti con endometriosi è in grado di compromettere il processo ovulatorio, la funzione spermatica e l'interazione dei gameti, nonché lo sviluppo embrionale di topo in vitro (25, 26, 27, 28, 29).

Le cellule endometriosiche degli espunti ectopici esprimono pressoché tutte le alterazioni descritte per l'endometrio eutopico; tuttavia queste caratteristiche risultano amplificate per l'influenza dei fattori sopra descritti. Le sostanze presenti a livello peritoneale, infatti, inducono nella cellula l'alterata espressione di numerose molecole, tra cui metalloproteinasi e loro inibitori (30), e anomalie nell'equilibrio PA/PAI (31),



**Fig. 2 - Decidualizzazione in vitro basale (BASALE), in presenza di fluido peritoneale di pazienti con endometriosi (FP-E) e di fluido peritoneale di controllo (FP-CTR) al giorno 3, 6, 9 e 12. Le concentrazioni di prolattina (PRL) per ciascun giorno sono espresse come percentuale dei valori misurati nella decidualizzazione basale ([PRL] basale = 100%). Significatività rispetto alla decidualizzazione in vitro basale: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.**

un sistema di proteasi coinvolte nel rimodellamento tissutale e nell'invasività. Il tessuto endometriosico ectopico presenta inoltre un'aumentata attività proliferativa ed angiogenetica ed un'incrementata attività dell'aromatasi rispetto all'endometrio eutopico, risultante in un'estrogenizzazione locale in grado di auto-amplificarsi sia per il già descritto meccanismo di feed-back con il sistema prostaglandinico sia grazie alla ridotta degradazione del 17-beta-estradiolo a causa della deficiente espressione della 17-beta-idrossisteroide-deidrogenasi (32).

### Ruolo dell'endometrio eutopico nel ridotto outcome riproduttivo

Numerosi studi suggeriscono un ruolo centrale dell'endometrio eutopico sulla patogenesi dell'infertilità in pazienti con endometriosi. L'endometrio di donne con endometriosi presenta, infatti, una deficitaria presenza di molecole di adesione importanti per l'impianto (15), nonché un'aberrante espressione genica e un alterato pattern proteico relativi ad una serie di fattori coinvolti nel cross-talk tra blastocisti ed endometrio durante la finestra dell'impianto come dimostrato da recenti studi che si avvalgono di metodiche quali microarray ed analisi proteomica (33, 34).

Nel nostro studio abbiamo valutato l'effettiva capacità di questo tessuto di andare incontro al processo di decidualizzazione. Questo fondamentale processo fa parte del complesso meccanismo dell'impianto in cui è richiesta la presenza di un embrione in grado di indurre le adeguate modifiche nell'endometrio e di un tessuto

endometriale pronto a ricevere tali segnali. La decidualizzazione delle cellule stromali endometriali (ESC) è un complesso processo differenziativo caratterizzato da modifiche morfologiche e funzionali prevalentemente sotto l'influenza del progesterone durante la fase secretiva del ciclo mestruale e di una serie di sostanze che agiscono in maniera autocrina e paracrina sulle cellule predeciduali al fine di ottenere il successo dell'impianto.

Il nostro intento è stato quello di voler comprendere meglio quanta parte della ridotta recettività endometriale sia dovuta effettivamente alle anomalie intrinseche della cellula endometriale e quanta responsabilità sia invece a carico dell'ambiente chimico-fisico condizionante. Lo studio si è avvalso pertanto della possibilità di riprodurre in vitro un ambiente che possa mimare quello intrauterino delle pazienti con endometriosi, coltivando cellule stromali endometriali di pazienti di controllo con fluidi peritoneali di donne con endometriosi. Questo step sperimentale si basa sul presupposto che tanto l'endometrio eutopico (all'interno della cavità uterina) quanto quello ectopico (i focolai di endometriosi extra-uterini) sono entrambi sottoposti ad un ambiente extracellulare simile; infatti, sia la cavità uterina che quella peritoneale sono caratterizzate dall'attivazione dei medesimi parametri immunologici e dal medesimo ambiente ormonale (iper-estrogenizzazione). Le cellule stromali sono state decidualizzate in vitro in presenza di fluido peritoneale endometrioso (o di controllo) e la performance di differenziazione è stata valutata tramite dosaggio nel medium di coltura di prolattina, importante marker di decidualizzazione.

I frammenti biotici necessari al nostro studio sono stati prelevati tramite curettage della cavità uterina di donne in fase medio-luteale del ciclo mestruale (XX-XXIII giorno dall'ultima mestruazione); si tratta di donne con ciclo regolare sottoposte a laparoscopia operativa in assenza di anomalie riconducibili alla patologia endometriosa (controlli).

In sede operatoria, laparoscopica e laparotomica, è stato altresì prelevato il fluido peritoneale di pazienti con endometriosi e di pazienti non affette (controlli); tali campioni sono stati centrifugati (10 minuti a 1000 rpm), aliquotati e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

I frammenti biotici endometriali (tanto endometriosi che di controllo) sono stati processati fino ad ottenere la separazione delle cellule stromali da quelle epiteliali. Le cellule stromali purificate sono state seminate in flasks da  $25\text{ cm}^2$  e coltivate con terreno DME contenente il 10% di siero fetale bovino ed una soluzione di antibiotici (Penicillina e Streptomina). Le piastre sono state mantenute a  $37^{\circ}\text{C}$  in atmosfera umidificata ed in presenza di una concentrazione costante di  $\text{CO}_2$  (5%). Dopo la confluenza nella flask T25, al fine di ottenerne la decidualizzazione in vitro, le cellule stromali sono state seminate in piastre da 24 pozzetti e coltivate per un periodo di tempo di 12 giorni in pre-

senza di estradiolo e progesterone alle concentrazioni di  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  M rispettivamente, come riportato in letteratura; tali concentrazioni risultano, per entrambi gli ormoni, comprese nei limiti fisiologici riscontrati a livello ematico durante una gravidanza normale. Il terreno di coltura addizionato di ormoni delle cellule stromali è stato cambiato ad intervalli regolari di tre giorni, raccogliendo e conservando a  $-20^{\circ}\text{C}$  il terreno prelevato da ciascun pozzetto. Ogni esperimento ha incluso pozzetti di controllo (coltivati con medium semplice); pozzetti con decidualizzazione basale; pozzetti con decidualizzazione in presenza di fluido peritoneale di controllo al 10% e in presenza di fluido peritoneale endometrioso al 10%. La titolazione della prolattina, prodotta dalle cellule stromali cresciute in presenza o assenza di stimoli ormonali o di fluidi peritoneali, è stata ottenuta mediante un kit commerciale immunoenzimatico. La sensibilità del saggio è di 1 ng/ml ed il coefficiente di variazione è al di sotto del 8-5%.

I risultati del nostro studio dimostrano che il fluido peritoneale di pazienti con endometriosi interferisce con il processo di decidualizzazione in vitro dello stroma di pazienti non affette. In particolare abbiamo verificato che lo stroma decidualizzato in presenza del fluido peritoneale endometrioso subisce una significativa inibizione nella produzione di prolattina al giorno 12 di trattamento con estrogeno e progesterone (Fig. 1). Infatti, rapportando le concentrazioni di prolattina misurate durante l'intero corso dell'esperimento (giorno 3, 6, 9 e 12) a quelle misurate al giorno 3 di trattamento (concentrazione di prolattina al giorno 3 = 100%), la concentrazione di prolattina cresce progressivamente sia nello stroma decidualizzato in condizioni basali sia in quello decidualizzato in presenza di fluido peritoneale normale, raggiungendo un livello circa 10 volte superiore a quello misurato al giorno 3; al contrario, in presenza di fluido peritoneale endometrioso la concentrazione di prolattina misurata al giorno 12 di trattamento è pari a circa 4 volte la concentrazione di prolattina del giorno 3. Come si osserva nella Figura 2, al giorno 6, 9 e 12 i livelli di prolattina ottenuti nella decidualizzazione in presenza di fluido peritoneale endometrioso risultano significativamente ridotti rispetto a quelli ottenuti nella decidualizzazione in presenza di fluido peritoneale di controllo (fino ad un massimo del 50% di riduzione al giorno 12), mentre nessuna differenza statisticamente significativa si osserva comparando decidualizzazione basale e decidualizzazione con fluido peritoneale di controllo.

Tali dati dimostrano che, a prescindere dalle alterazioni a carico della cellula decidualizzata proveniente da donne con endometriosi, l'ambiente in cui questo processo avviene contribuisce di per sé ad ostacolare il processo fisiologico di differenziazione endometriale.

Ulteriori approfondimenti nell'analisi del processo di decidualizzazione in vitro dell'endometrio eutopico

di donne con endometriosi contribuiranno a chiarire l'eventuale ruolo di tale processo nell'eziopatogenesi dei disturbi della fertilità cui la sindrome spesso è associata, con il fine ultimo di contribuire ad un più mirato approccio terapeutico.

In quest'ottica, il confronto tra il processo di decidualizzazione di endometrio sano e quello di endometrio di pazienti affette (alle medesime condizioni di coltura) ci permetterebbe di individuare, tra i fattori coinvolti nell'impianto, quelli eventualmente alterati nell'endometrio di pazienti con endometriosi, sottoposto a decidualizzazione in vitro. In particolare sono in

corso esperimenti di Real-Time-PCR per valutare l'espressione genica di alcuni geni regolatori dell'apoptosi, di molecole di adesione, citochine e fattori angiogenetici.

Questi fattori, di cui è stata ipotizzata una disregolazione nell'endometrio endometrioso durante la finestra dell'impianto, non sono mai stati studiati nella decidua di pazienti con la sindrome. Lo studio del loro pattern d'espressione potrà fornirci informazioni preziose circa possibili alterazioni funzionali dei complessi meccanismi coinvolti nel mantenimento della gravidanza iniziale.

## Bibliografia

1. SAMPSON J.A.: Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynaecol* 14:422-429, 1927.
2. WINGFIELD M., MACPHERSON A., HEALY D.L., ROGERS P.W.A.: Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 64:340-6, 1927.
3. JONES R.K., BLUMER J.N., SEARLE R.F.: Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. 10:3272-3279,1995.
4. DONNEZ J., SMOES P., GILLEROT S. et al.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 13:1686-1690,1998.
5. KIM S.H., CHOI Y.M., CHAE H.D., KIM C.H., KANG B.M.: Increased expression of endoglin in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 76 (5):918-22, 2001.
6. STEELE R.W., DMOSWIKI W.P., MANNER D.J.: Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 6:33-6, 1984.
7. TSENG J.F., RYAN I.P., MILAM T.D., MURAI J.T., SCHERLOCK E.D., LANDERS D.V., et al.: Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1118-22, 1996.
8. OTA H., IGARASHI S., HAYAKAWA M., MATSUI T., TANAKA H., TANAKA T.: Effect of danazol on the immunocompetent cells in the eutopic endometrium in patients with endometriosis: a multicenter cooperative study. *Fertil Steril* 65:545-51,1996.
9. AKOUM A., LEMAY A., BRUNET C., HÉBERT J.: Secretion of monocyte chemotactic protein-1 by cytokine-stimulated endometrial cells of women with endometriosis. *Le Group d'Investigationen Gynécologie. Fertil Steril* 63:322-8, 1995.
10. LEONARD E.J., YOSHIMURA T.: Human monocyte chemoattract protein-1 (MCP<sub>1</sub>). *Immunol Today* 97-101, 1990.
11. NOBLE L.S., TAKAYAMA K., PUTMAN J.M., JOHNS D.A., HINSHELWOOD M.M., AGARWAL V.R., ZHAO Y., CARR B.R., SULUN S.E.: Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:600-606, 1997.
12. KITAWAKI J., NOGUCHI T., AMATSU T., MAEDA K., TSUKAMOTO K., YAMAMOTO T., FUSHIKI S., OSAWA Y., HONJO H.: Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 57:514-519, 1997.
13. LEYENDECKER G., KUNZ G., NOE M., HERBERTZ M., MALL G.: Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update* 4; 5:752-762,1998.
14. DMOWSKI W.P., GEBEL H., BRAUN D.P.: Decreased apoptosis and sensitivity to mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update* 4 (5):696-701,1998.
15. GEBEL H.M., BRAUN D.P., TAMBUR A., FRAME D., RANA N., DMOWSKI W.P.: Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 69:1042-6, 1998.
16. LESSEY B.A., CASTELBAUM A.J., SAWIN S.W. et al. Aberrant integrin expression in the endometrium of woman with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 79:643-649,1994.
17. SOMIGLIANA E., VIGANÒ P., GRAFFURI B. et al.: Endometrial stromal cells as a source of Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 molecules. *Hum Reprod*, 11:1190-1194, 1996.
18. OLIVE D.L., HANEY A.F., WEINBERG J.B.: The nature of intraperitoneal exudates associated with infertility: peritoneal fluid and serum lisozyme activity. *Fertil Steril* 48:802-6,1987.
19. KLEIN N.A., MONTOYA I.A., SCHENKEN R.S.: Characterization of residence lymphoid cell population in endometriosis. In *Soc Gynecol Invest Abst* 518, 39th Annual Meeting, San Antonio, TX, 1992.
20. OOSTERLYNCK D.J., CORNILLIE F.J., WEAR M., VANDEPUTTE M., KONINCKX P.R.: Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*, 56:45-51, 1991.
21. WEED J.C., ARQUEMBOURG P.C.: Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol*, 23:885-93, 1980.
22. MATHUR S., PERESS M.R., WILLIAMSON H.O., YOUMANS C.D., MANEY S.A., GRAVIN A.J., et al.: Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol*, 50:259-66,1982.

23. GLEICHER N., DMOWSKI W.P., SIEGEL I., LIU T.L., FRIBERG J., RADWANSEA E., et al.: Lymphocyte subset in endometriosis. *Obstet Gynecol*, 63:463-6, 1984.
  24. HARADA T., IWABE T., TERAKAWA N.: Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril*, 76 (1):1-10, 2001.
  25. CURTIS P., JACKSON A.E.: Adverse effects on sperm movement characteristics women with minimal and mild endometriosis. *Br J Obstet Gynecol*, 100:165-9, 1993.
  26. ARUMUNGAN K.: Endometriosis and infertility: raised iron concentration in the peritoneal fluid and its effect on the acrosome reaction. *Hum Reprod* 9:1153-7, 1994.
  27. TAKETANI Y., KUO T.M., MIZUNO M.: Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 167:265-70, 1992.
  28. MARCOS R.N., GIBBONS W.E., FINDLEY W.E.: Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril*, 44:678-83, 1985.
  29. TUMMON I.S., MACLIN V.M., RADWANSKA E., BINOR Z., DMOWSKI W.P.: Ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. *Fertil Steril*, 55:716-20, 1988.
  30. UEDA M., YAMASHITA Y., TAKEHARA M., TERAJ Y., KUMAGAI K., UEKI K., KANDA K., HUNG Y.C., UEKI M.: Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, 16 (5): 391-402, 1988.
  31. BRUSE C., BERGQVIST A. CARLSTROM K., FIANU-JONASSON A., LECANDER I., ASTEDT B.: Fibrinolytic factor in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriotic and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril*, 70 (5):821-6, 1998.
  32. ZEITOUN K.M., TAKA YAMA K., SASANO H., et al.: Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:4474-4480, 1998.
  33. GIUDICE L.C., TELLES T.L., LOBO S., KAO L.C.: The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to discovery. *Ann NY Acad Sci* 955:252-264.
  34. KAO L.C., GERMeyer A., TULAC S., LOBO S., YANG J.P., TAYLOR R.N., OSTEEEN K., LESSEY B.A., GIUDICE L.C.: Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 144 (7):2870-2881, 2003.
-