

JOÃO ANTONIO DIAS JUNIOR

**Avaliação do percentual de células *Natural Killer* e de auto-anticorpos em sangue periférico de pacientes com endometriose pélvica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão

SÃO PAULO

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dias Junior, João Antonio

Avaliação do percentual de células *Natural Killer* e de auto-anticorpos em sangue periférico de pacientes com endometriose pélvica / João Antonio Dias Junior. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Mauricio Simões Abrão.

Descritores: 1.Endometriose 2.Células natural Killer 3.Autoanticorpos  
4.Marcadores biológicos

USP/FM/DBD-195/10

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **João e Vera**, pelo apoio, presença, amor e pelo eterno exemplo em todos os aspectos de minha vida.

Aos meus queridos irmãos **Rodrigo, Thiago e Daniel**, companheiros e  
AMIGOS inseparáveis.

À minha amada esposa **Ana Luisa**, pelo amor incondicional, pelo apoio, por toda a segurança e companheirismo.

Ao meu filho **Pedro**, que me permite diariamente redescobrir as  
alegrias de viver.

## **AGRADECIMENTOS**

Um agradecimento especial ao meu orientador **Professor Doutor Mauricio Simões Abrão**, por ter me oferecido a oportunidade começar a pensar cientificamente durante minha residência médica, pelas inúmeras oportunidades profissionais oferecidas, pelos conselhos e convivência pessoal que nos tornaram amigos;

Ao **Doutor Sérgio Podgaec**, mais um amigo que conquistei enquanto discutíamos ciência e trabalhávamos juntos;

Ao **Doutor Ricardo Manoel de Oliveira** por todo auxílio e disponibilidade na execução deste trabalho;

Ao **Professor Doutor Edmund Chada Baracat** pela oportunidade de realizar pós-graduação na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela importante colaboração na revisão deste trabalho;

Aos colegas **Doutores Luiz Flávio Cordeiro Fernandes, Midgley Gonzales, Flávia Fairbanks, Patrick Bellelis, Leticia Coeho, Paula Fagundes** e todos os outros membros do setor de endometriose pelo apoio e disponibilidade;

A **Sra Anna Cristina** todos os funcionários da RDO Diagnósticos Médicos pelo auxílio e realização dos exames laboratoriais deste trabalho;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela contribuição financeira que viabilizou esta pesquisa;

A Sra **Luciana Nucci** pela dedicação à avaliação estatística;

Às **pacientes**, motivo pelo qual estudamos e pesquisamos, por permitirem a realização deste trabalho.

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver);

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras e Gráficos

Resumo

Summary

|   |                   |    |
|---|-------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO .....  | 1  |
| 2 | OBJETIVOS .....   | 18 |
| 3 | MÉTODOS .....     | 19 |
| 4 | RESULTADOS .....  | 36 |
| 5 | DISCUSSÃO .....   | 51 |
| 6 | CONCLUSÕES .....  | 74 |
| 7 | ANEXOS.....       | 75 |
| 8 | REFERÊNCIAS ..... | 87 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|             |   |
|-------------|---|
| ANA -       | Anticorpos antinucleares  |
| Ac -        | Anticorpo   |
| aCL -       | Anticardiolipina  |
| aPS -       | Antifosfatidilserina  |
| Anti-TG -   | Anti-tireoglobulina   |
| Anti-TPO -  | Anti-Tireoperoxidase  |
| ASRM -      | <i>American Society for Reproductive Medicine</i> ou Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva                      |
| CD -        | <i>Cluster of Differentiation</i> ou Grupamento de diferenciação  |
| CPH -       | Complexo Principal de Histocompatibilidade  |
| EDTA -      | <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiaminotetracético   |
| ELISA -     | Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima   |
| ESHRE -     | <i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i> ou Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia |
| FAPESP -    | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  |
| HLA -       | human leukocyte antigen ou antígeno leucocitário humano   |
| HCFMUSP -   | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo   |
| IgA -       | Imunoglobulina A  |
| IgE -       | Imunoglobulina E  |
| IgG -       | Imunoglobulina G  |
| IgM -       | Imunoglobulina M  |
| IFN gama -  | Interferon Gama   |
| IC -        | Intervalo de confiança  |
| IL -        | Interleucina  |
| KIR -       | <i>Killer Immunoglobulin-like receptor</i> ou receptores de membrana das células NK semelhantes a imunoglobulinas     |
| LES -       | Lúpus Eritematoso Sistêmico   |
| n -         | número de pacientes   |
| NK -        | <i>natural killer</i>   |
| ROC curve - | receiver operator characteristic curve  |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Características clínicas das pacientes estudadas .....  | 37 |
| Tabela 2 - Achados cirúrgicos e histopatológicos das pacientes com endometriose.....   | 38 |
| Tabela 3 - Dosagem de células NK e auto-anticorpos nas pacientes com e sem endometriose .....  | 39 |
| Tabela 4 - Achados Laboratoriais das pacientes divididas conforme a fase do ciclo menstrual.....   | 40 |
| Tabela 5 - Dosagem de células NK e auto-anticorpos nas pacientes sem e com endometriose, divididas conforme o estadiamento.....  | 42 |
| Tabela 6 - Achados Laboratoriais das pacientes estudadas, divididas conforme o local comprometido pela endometriose .....  | 43 |
| Tabela 7 – Achados Laboratoriais das pacientes estudadas, divididas conforme o local comprometido pela endometriose, destacando-se as pacientes com comprometimento de retossigmóide ..... | 44 |
| Tabela 8 - Achados Laboratoriais das pacientes com endometriose, divididas conforme a classificação histológica da endometriose.....   | 45 |
| Tabela 9 - Sensibilidade e especificidade, valores preditivos positivo, negativo e acurácia do percentual das células NK na predição de endometriose de retossigmóide.....                 | 48 |
| Tabela 10 - Regressão logística para o diagnóstico endometriose de retossigmóide .....   | 49 |
| Tabela 11 - Resultados em modelo de probabilidades para endometriose de retossigmóide .....  | 50 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática resumida do sistema imune.....   | 5  |
| Figura 2 - Dinâmica do estudo .....   | 23 |
| Figura 3 - Classificação da American Society for Reproductive Medicine<br>revisada em 1996, extraída do texto original .....                              | 26 |
| Figura 4 - Fotos de videolaparoscopia em pacientes com endometriose<br>peritoneal superficial .....   | 27 |
| Figura 5 - Fotos de laparoscopia em pacientes com endometriomas<br>ovarianos .....  | 28 |
| Figura 6 - Fotos de laparoscopia em pacientes com endometriose<br>profunda intestinal.....  | 28 |
| Figura 7 - Fotomicrografias ópticas de espécimes com endometriose.....  | 30 |
| Figura 8 - Laudo ilustrativo emitido após citometria de fluxo para<br>quantificação de células Natural Killer em citômetro de fluxo<br>FACSCalibur® ..... | 32 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| Gráfico 1 - Curva ROC, analisando sensibilidade e especificidade do<br>percentual de células NK para predição de endometriose,<br>endometriose profunda ou endometriose com<br>comprometimento de retossigmóide ..... | 47 |
|---|----|

## RESUMO

Dias Junior JA. *Avaliação do percentual de células Natural Killer e de auto-anticorpos em sangue periférico de pacientes com endometriose pélvica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 95p.

**Objetivo:** o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de auto-anticorpos e a dosagem da concentração de células *Natural Killer* (NK) no sangue periférico em pacientes com endometriose. **Métodos:** Entre dezembro de 2004 e dezembro de 2007 foram avaliadas 155 pacientes submetidas a videolaparoscopia, divididas em um grupo sem endometriose (n=55) e outro com endometriose (n=100). Foi coletada amostra de sangue periférico de todas as pacientes no momento da laparoscopia e nessa amostra foi realizada a quantificação do percentual de células NK em relação aos linfócitos periféricos (por citometria de fluxo), e a determinação dos seguintes auto-anticorpos: anticorpos antinucleares (ANA, por imunofluorescência indireta), anticorpos antitireoglobulina e antiperoxidase (anti-TG e anti-TPO, por eletroquimioluminescência), anticorpos anticardiolipina e antifosfatidilserina (aCL e aPS IgG, IgM e IgA, todos por ensaio imunoenzimático). Além da presença de endometriose, essas pacientes também foram avaliadas quanto ao estadiamento, os locais de doença, relações com a fase do ciclo, e a classificação histológica dessa doença. **Resultados:** as pacientes com endometriose apresentaram percentual de células NK (média  $\pm$  DP de  $15,3 \pm 9,8\%$ ) superiores às que sem a doença (média  $\pm$  DP de  $10,6 \pm 5,8\%$ ),  $p < 0,001$ . Quanto aos auto-anticorpos, as portadoras de endometriose também apresentaram positividade para ANA mais frequentemente (33%) que as pacientes do grupo controle (12,7%),  $p = 0,006$ . Quanto aos anti-TG, anti-TPO, anti-CL (IgG, IgM e IgA) e aPS (IgG, IgM e IgA), não houve diferenças estatísticas quanto à sua positividade. As células NK também mostraram-se mais elevadas nas portadoras de endometriose em estádios avançados e naquelas com comprometimento de retossigmóide, grupo no qual encontramos o maior percentual de células NK com concentração média de  $19,8 \pm 10,3\%$ . Concentrações de células NK  $\geq 12,5\%$  podem ser usadas como marcadores de endometriose em retossigmóide, com sensibilidade de 73% e especificidade de 65%. Utilizando-se de um modelo estatístico de probabilidades, demonstramos que associação desse marcador (NK  $\geq 12,5\%$ ) com a presença de sintomas como dor e/ou sangramento intestinal durante a menstruação nos possibilitou estimar uma probabilidade de comprometimento de retossigmóide de 60,4%. **Conclusões:** pacientes com

endometriose apresentam maior concentração de células NK periféricas, além de maior prevalência de ANA positivo em relação àquelas sem endometriose. As células NK aumentam nas pacientes com endometriose predominantemente nos estádios avançados, com comprometimento de retossigmóide. Nesse sentido poderiam ser utilizadas como marcadores diagnósticos desse tipo de comprometimento da doença, principalmente se forem avaliadas em conjunto com os sintomas das pacientes.

**Descritores:** 1.Endometriose 2.Células Natural Killer 3.Auto-anticorpos  
4.Marcadores biológicos

## SUMMARY

Dias Junior JA. *Evaluation of the percentage of natural killer cells and autoantibodies in the peripheral blood of patients with pelvic endometriosis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 95p.

**Objectives:** The objective of this study was to evaluate the prevalence of autoantibodies and the percentage of natural killer (NK) cells in the peripheral blood of patients with endometriosis. **Methods:** Between December 2004 and December 2007, 155 patients submitted to videolaparoscopy were evaluated. Patients were divided into two groups: one group of women without endometriosis (n = 55) and another in which all the women had endometriosis (n = 100). Samples of peripheral blood were collected from all the patients at the time of laparoscopy and flow cytometry was used to determine the percentage of NK cells in relation to peripheral blood lymphocytes in these samples. In addition, the following autoantibodies were measured: antinuclear antibodies (ANA) by indirect immunofluorescence, anti-thyroglobulin and anti-thyroid peroxidase antibodies (anti-TG and anti-TPO) by electrochemiluminescence, and anticardiolipin and anti-phosphatidylserine antibodies (aCL and aPS IgG, IgM and IgA), all performed using immunoenzymatic assay. In addition to the presence of endometriosis, these patients were also evaluated with respect to staging, to the sites of the disease, any association with the phase of the menstrual cycle and the histological classification of the disease. **Results:** The patients with endometriosis had a higher percentage of NK cells ( $15.3 \pm 9.8\%$ ; mean  $\pm$  SD) compared to those without the disease ( $10.6 \pm 5.8\%$ ; mean  $\pm$  SD), ( $p < 0.001$ ). Evaluation of the autoantibodies showed that positivity for ANA was more common in the group of patients with endometriosis (33%) compared to the patients in the control group (12.7%), ( $p = 0.006$ ). With respect to anti-TG, anti-TPO, aCL (IgG, IgM and IgA) and aPS (IgG, IgM and IgA), no statistically significant differences were found between the groups of patients with or without endometriosis. NK cell concentrations were also found to be higher in patients with advanced stages of endometriosis and in those in whom the rectosigmoid was affected by the disease, this being the group in which the highest percentage of NK cells was found, with mean concentrations of  $19.8 \pm 10.3\%$ . NK cell concentrations  $\geq 12.5\%$  may be used as markers of endometriosis of the rectosigmoid, with sensitivity of 73% and specificity of 65%. Using a statistical model of probability, these findings showed that the association of this marker (NK  $\geq 12.5\%$ ) with the presence of symptoms such as pain

and/or intestinal bleeding during menstruation permitted an estimation to be made of a likelihood of 60.4% of rectosigmoid endometriosis. **Conclusions:** Patients with endometriosis have higher percentages of peripheral NK cells, as well as a greater prevalence of positive ANA compared to those without endometriosis. The concentration of peripheral NK cells increases in patients with endometriosis, predominantly in patients with advanced stages of the disease and those in whom the rectosigmoid is affected. Therefore, the concentration of NK cells in peripheral blood could be used as a diagnostic marker of this type of endometriosis, particularly when evaluated together with patients' symptoms.

**Descriptors:** 1.Endometriosis 2.Natural Killer cells 3.Autoantibodies  
4.Biological markers

## **1 INTRODUÇÃO**

---

A endometriose é uma doença que compromete 10-15% das mulheres na menacme, caracterizada pelo desenvolvimento de tecido endometrial (epitélio glandular e/ou estroma) em localização extra-uterina, normalmente nos ovários e peritônio pélvico e mais raramente em porções dos tratos digestivo e urinário (Giudice e Kao, 2004). Os sintomas mais freqüentes são dismenorréia, dispareunia de profundidade, dor pélvica acíclica, infertilidade, além de sintomas intestinais e urinários cíclicos (Bulun, 2009). As portadoras dessa afecção podem esperar muito tempo desde o início dos sintomas até que se faça o diagnóstico, percorrendo hospitais e consultórios por até 7 anos desde o início dos sintomas até que o diagnóstico seja estabelecido (Arruda *et al.*, 2003).

Os implantes de endometriose podem ser em superficiais e profundos, na dependência de apresentarem-se com profundidade de infiltração menor ou maior/igual a 5mm, tendo sido demonstrado que a doença profunda relacionada-se a maior intensidade de dor (Cornillie *et al.*, 1990). Nisolle e Donnez, em 1997, lançaram um conceito que dividiu a endometriose em três doenças distintas: peritoneal superficial, ovariana e de septo retovaginal. A doença peritoneal seria uma doença superficial com menos que 5mm de profundidade, a ovariana incluiria os implantes

superficiais de ovário e os endometriomas. Já doença que naquele momento foi chamada de septo retovaginal, seria aquela que causaria obliteração do fundo-de-saco posterior (Nisolle & Donnez, 1997). Hoje denominada doença profunda, caracteriza-se por focos de profundidade superior a 5mm acometendo as regiões retro-cervical, para-cervical, septo reto-vaginal, diversas porções do tubo digestivo como retossigmóide, além de ureteres e bexiga (Chapron *et al.*, 2004).

Dentre as teorias clássicas sobre a etiopatogenia da doença destacam-se a da menstruação retrograda (Sampson, 1927) e da metaplasia celômica (Meyer, 1919). Contudo a presença de células endometriais viáveis durante a menstruação é encontrada em até 90% das mulheres (Halme *et al.*, 1984), no entanto nem todas desenvolvem a doença, o que sugere a contribuição de outros fatores para o desenvolvimento da doença.

Existem evidências de que fatores imunológicos, inflamatórios, genéticos e ambientais tenham importância nos processos que permitem que as células endometriais localizadas em ambiente extra-uterino se implantem e/ou desenvolvam, permitindo o aparecimento da endometriose (Simoens *et al.*, 2007; Bulun, 2009). Esses fenômenos poderiam gerar alterações imunes celulares, de substâncias como citocinas ou alguns anticorpos em sangue periférico, o que em tese poderia ser usado para se estabelecer algum tipo de marcador diagnóstico para essa afecção (Abrao *et al.*, 1999; Bedaiwy *et al.*, 2002).

## 1.1 Considerações gerais sobre o sistema imune

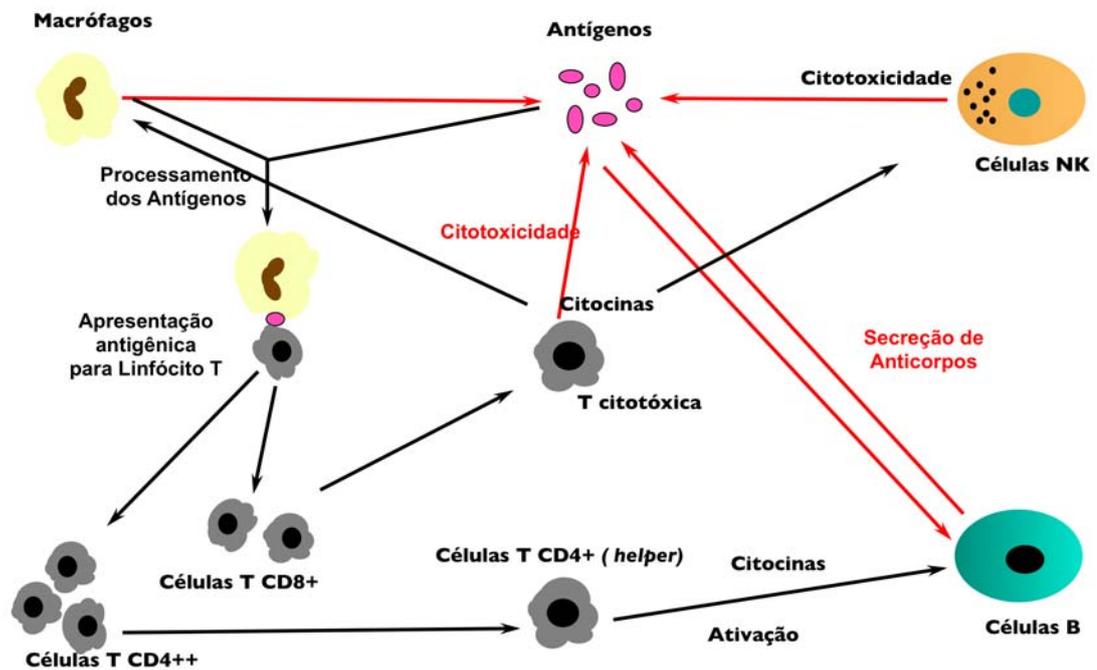
O sistema imune consiste numa complexa interação entre diferentes tipos celulares como linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células *natural killer (NK)* e substâncias secretadas por essas células como anticorpos (Acs), interleucinas (ILs) e componentes do sistema complemento. Sua função é identificar e destruir micro-organismos, células neoplásicas ou que não sejam da própria pessoa. Classifica-se a resposta imune em inata e adquirida. A resposta inata caracteriza-se pela ausência de necessidade de estímulos ou memória imunológica prévia, utiliza barreiras epiteliais, células fagocitárias (neutrófilos, monócitos, macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios como o complemento e citocinas (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e as células *NK* para destruir microorganismos estranhos (Benjamini, 2002).

A resposta imune adquirida é um padrão de resposta mais especializado, que envolve a proliferação de linfócitos B e T antígeno-específicos que ocorre quando receptores de membrana dessas células entram em contato com antígenos estranhos ao organismo, com o objetivo de otimizar a resposta imune, além de gerar mecanismos de memória imunológica (Abbas, 2008).

Todas as células do sistema imune apresentam em sua membrana celular algumas proteínas que são utilizadas como receptores que norteiam a resposta imunológica a determinados estímulos. Essas proteínas são utilizadas como marcadores fenotípicos, que podem diferenciar os tipos

celulares, ou seja um grupamento de diferenciação, sendo designadas como *Cluster of Differentiation* (CD). Os linfócitos humanos podem ser divididos em 3 principais categorias (Linfócitos T, Linfócitos B e células NK) baseados nas suas funções biológicas e presença de determinados antígenos de superfície (CD), por exemplo, as células NK podem ser caracterizadas conforme seus antígenos de superfície como (CD3-/CD56+/CD16+), enquanto outros linfócitos são CD3+. Os linfócitos T podem ser classificados em Linfócitos T *Helper* ou auxiliares (CD3+CD4+CD8-) e linfócitos T supressores ou citotóxicos (CD3+CD4-CD8+). Os linfócitos B apresentam em suas membranas receptores para proteínas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe II além de CD19+ e CD21+ (Delves e Roitt, 2000a).

A **figura 01** ilustra de forma resumida os principais aspectos do sistema imune. Normalmente, a primeira linha de defesa imunológica é constituída pelos macrófagos e células *natural killer* (NK), ambos com a função de destruir sem a necessidade de memória imunológica as células alvo ou antígenos estranhos. Cabe a células como os macrófagos destruir esses elementos, além de processá-los e apresentá-los a linfócitos T fato que irá deflagrar uma proliferação de linfócitos T (Abbas, 2008), com funções que serão descritas a seguir.



**Figura 1 - Representação esquemática resumida do sistema imune**

Paralelamente aos mecanismos citotóxicos dos macrófagos e das células NK, os linfócitos B entram em contato com essas células e antígenos estranhos através de imunoglobulinas de membrana permitindo o reconhecimento desses antígenos como “próprios” ou “não-próprios”. Graças a esse reconhecimento, ocorre proliferação de clones de linfócitos B, que serão responsáveis pela produção de anticorpos (Delves e Roitt, 2000a). Esses por sua vez, otimizam a resposta imune, quer seja inativando antígenos solúveis, quer seja facilitando a fagocitose dos macrófagos, quer seja estimulando respostas imunes mediadas por anticorpos em células NK. Esse tipo de resposta imune é chamada de resposta imune humoral (Abbas, 2008).

Os anticorpos são proteínas (imunoglobulinas) secretadas pelos linfócitos B com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas de aminoácidos. Graças à conformação das cadeias pesadas, podemos classificar essas substâncias como imunoglobulinas de cinco classes principais: IgG, IgM, IgA, IgE e IgE. Cada classe tem mecanismos e locais de ações específicos, sempre com fins de otimizar a resposta imune (Delves e Roitt, 2000a).

Algumas situações clínicas podem levar à produção de anticorpos contra antígenos próprios, o que gera uma resposta auto-imune e destruição de células próprias, caracterizando assim doenças auto-imunes causadas por auto-anticorpos. Entre essas doenças podemos citar o lúpus eritematoso sistêmico (anticorpos anti-nucleares e contra outras proteínas celulares), *miastenia gravis* (anticorpos anti-receptor de acetilcolina) e tireoidite auto-imune de Hashimoto (anticorpos anti-tiroglobulina e/ou anti-tiroperoxidase) (Delves e Roitt, 2000b).

A apresentação de antígenos pelos macrófagos aos linfócitos T ocorre através de proteínas de membrana celular chamadas de Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) classificadas como do tipo I e II, e essa apresentação gera proliferação dos linfócitos T e produção de diversas citocinas (Benjamini, 2002). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estimulados através de proteínas do CPH tipo I irão produzir citocinas que têm a capacidade de estimular a atividade citotóxica dos macrófagos e células NK, além de destruírem diretamente os antígenos ou células alvo, sendo por isso chamados de linfócitos T citotóxicos). Já os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estimulados

através da apresentação antigênica através de proteínas do CPH tipo II produzem citocinas que auxiliam os linfócitos B a produzir anticorpos, otimizando assim a resposta imune humoral, sendo por isso chamados de linfócitos T auxiliares (Delves e Roitt, 2000b).

As células NK são uma linhagem de células do sistema imune, originadas predominantemente na medula óssea de um precursor comum ao linfócito T e constituem 5-20% da subpopulação linfocitária no sangue periférico (Abbas, 2008). Sua função é a de destruir células infectadas por vírus e células neoplásicas através de liberação de substâncias como perforinas e proteases que causam nas células alvo necrose ou apoptose. Além disso as células NK secretam citocinas inflamatórias como o interferon gama, que ativa os macrófagos, aumentando sua capacidade de fagocitose. Fenotipicamente as células NK caracterizam-se como CD3- CD16+ CD56+, existindo ainda alguns autores que utilizam o CD57+ no lugar do 56 para a identificação dessas células (Delves e Roitt, 2000a).

Essas células reconhecem seus alvos de duas maneiras. O mecanismo de reconhecimento mais importante, que é característico das células NK, é o de receptores de membrana semelhantes a imunoglobulinas chamados *Killer Immunoglobulin-like receptor* (KIR) que podem ser ativadores e inibidores (*killer immunoglobulin-like-activating receptor* e *killer immunoglobulin-like-inhibitory receptor*). Os KIRs *ativadores* da células NK reconhecem moléculas presentes na superfície de todas as células nucleadas, enquanto os receptores inibidores reconhecem moléculas do CPH Classe I, as quais também estão presentes em todas as células nucleadas (Moretta *et al.*, 1995).

Assim, ao entrar em contato com as células de nosso organismo, as células NK graças aos seus receptores ativadores irão destruir essa célula, no entanto, se o receptor inibitório for ativado, graças à presença do CPH-I não haverá destruição. Esses receptores inibitórios reconhecem as células como próprias e normais graças ao contato com as moléculas da classe I do CPH expressas nessas células (Moretta *et al.*, 2002). Todas as células nucleadas humanas expressam moléculas do CPH Classe I, mas perdem essa capacidade ao serem infectadas por vírus ou ao sofrerem transformações neoplásicas. Por não expressarem essas proteínas, acabam não ativando os receptores inibitórios das células NK e com isso as células NK acabam destruindo essas células próprias “modificadas”, graças ao contato pelos KIRs ativadores (Delves e Roitt, 2000a).

No segundo mecanismo de ação das células NK, elas possuem receptores onde se ligam a Imunoglobulina G (IgG), o que permite que as células NK se adiram a antígenos reconhecidos por esses anticorpos; esses receptores são identificados como CD16 e esse tipo de resposta imune é chamada de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Moretta *et al.*, 2002).

Além da regulação mediada pelos receptores ativadores, inibitórios e relacionados aos anticorpos, as células NK podem ser ativadas através de estímulos diretos pelas citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 e por altas concentrações de IL-2 (Delves e Roitt, 2000a). A principal citocina efetora produzida pelas células NK é o interferon gama (IFN-gama), que aumenta a atividade da própria célula NK além de estimular a atividade fagocítica de macrófagos (Abbas, 2008).

## 1.2 O sistema imune e suas relações com a endometriose

A endometriose é associada a alterações do sistema imune inato e adquirido, tanto nos componentes humoral quanto celular (Lebovic *et al.*, 2001). Nos anos 80, Weed e Arquembourg foram os pioneiros em propor a participação do sistema imune nas pacientes com endometriose; estudando o binômio infertilidade e endometriose com a hipótese de que nas pacientes com endometriose, os endometriomas funcionariam como antígenos, que causariam resposta auto-imune, com produção de auto-anticorpos contra antígenos endometriais e do complemento, elementos que se depositariam à distância, no endométrio tópico das portadoras da doença (Weed e Arquembourg, 1980). Na mesma década estudou-se macacas Rhesus com e sem endometriose, detectando-se diminuição da resposta imune celular nas macacas portadoras de endometriose (Dmowski *et al.*, 1981). Desde então, diversos autores têm se dedicado ao estudo da participação do papel do sistema imune na endometriose, postulando-se que através da menstruação retrograda, as células endometriais penetrariam na cavidade peritoneal e graças a disfunções imunológicas ocorreria desenvolvimento destas células, formando o foco inicial da doença (Harada *et al.*, 2001; Bulun, 2009).

Em 1988, Hill *et al.* caracterizaram os tipos de leucócitos encontrados no sangue e fluido peritoneal de 33 pacientes com endometriose comparadas com 9 pacientes com infertilidade sem causa aparente e 8 pacientes férteis. Esses autores não encontraram diferenças nos subtipos de

leucócitos (macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e células NK) no sangue periférico das pacientes com ou sem endometriose. No líquido peritoneal foram encontrados mais macrófagos e células NK nas portadoras de endometriose, independentemente do estadiamento (Hill *et al.*, 1988).

Além de elementos celulares, substâncias como citocinas e auto-anticorpos vêm sendo estudados tanto no sangue periférico quanto no líquido peritoneal e os resultados quanto a suas quantificações e prevalências são conflitantes (Barcz *et al.*, 2000; Podgaec *et al.*, 2007). Iremos nos concentrar nos estudos que avaliaram as relações entre as células NK e os principais fenômenos auto-imunes mediados por anticorpos nas pacientes com endometriose.

### **Células Natural Killer**

As células NK participam ativamente dos mecanismos imunes frente às células endometriais regurgitadas para a cavidade peritoneal. O primeiro estudo publicado em língua inglesa sobre o comportamento das células NK em pacientes com endometriose foi realizado na Bélgica. Em 1991, Oosterlynck e colaboradores publicaram um interessante trabalho no qual avaliaram o percentual de células NK em relação à subpopulação linfocitária em sangue periférico, além de avaliar a citotoxicidade das mesmas em relação ao endométrio tópico dessas pacientes. Para isso avaliaram 34 pacientes, submetidas a videolaparoscopia por dor e/ou infertilidade, divididas segundo os achados laparoscópicos em 24 com endometriose e 10 pacientes sem endometriose. Inicialmente os autores avaliaram por

citometria de fluxo o percentual de células NK no sangue periférico, encontrando 17.1% e 18.1% de NK entre os linfócitos circulantes nos grupos sem e com endometriose, sem encontrar diferença estatística. Ao avaliar a citotoxicidade *in vitro* os autores notaram que as células NK foram responsáveis pela lise de células endometriais e que a citotoxicidade das células NK periféricas das pacientes com endometriose era menor que as do grupo controle, e que quanto maior o estadiamento, menor a capacidade citotóxica das células NK (Oosterlynck *et al.*, 1991). Esse mesmo grupo relatou diminuição da atividade das células NK também no líquido peritoneal das portadoras de endometriose(Oosterlynck *et al.*, 1992).

Tanaka *et al.* em 1992 também realizaram estudo avaliando a citotoxicidade das células NK periféricas, sem avaliar o percentual de células NK em sangue periférico. A citotoxicidade das células NK periféricas foi avaliada contra células alvo obtidas de pacientes com leucemia mielóide, chamadas de células humanas K562 (diferentemente do estudo de Oosterlynck de 1991, que estudou a citotoxicidade contra células endometriais tópicas). Além disso, os autores também avaliaram as repercussões do soro de pacientes com endometriose sobre um ensaio de citotoxicidade realizado entre células NK de doadores hígidos e as mesmas células alvo K562. Ficou demonstrada uma diminuição estatisticamente significativa da citotoxicidade das células NK no grupo de pacientes com endometriose. Além disso, o soro de pacientes com endometriose foi capaz de inibir a ação citotóxica de células NK de maneira significativa em relação ao soro de pacientes sem endometriose (Tanaka *et al.*, 1992).

Iwasaki *et al.*, (1993) realizaram quantificação de células mononucleares no sangue periférico e no líquido peritoneal em 45 pacientes, das quais 19 com endometriose demonstrando um aumento significativo da concentração dessas no líquido peritoneal das pacientes com endometriose. Ao avaliar os subtipos de células mononucleares, detectou-se um aumento significativo de linfócitos T supressores e diminuição significativa de linfócitos T citotóxicos nas pacientes com endometriose, tanto no sangue quanto no líquido peritoneal. Ao se determinar a subpopulação linfocitária, quanto às células NK ficou demonstrado um percentual de células NK elevado nas pacientes com endometriose em relação ao grupo controle, mas sem atingir significância estatística tanto no líquido peritoneal ( $21,3 \pm 9,0$  x  $17,8 \pm 9,9$ , respectivamente), quanto no sangue periférico, onde o percentual de células NK foi de  $23,3 \pm 9,6$  nas portadoras de endometriose e de  $18,6 \pm 8,9$  no grupo controle. (Iwasaki *et al.*, 1993).

Kikuchi *et al.*, (1993) avaliaram o percentual de células NK no sangue periférico de 10 pacientes com endometriose comparando com 10 pacientes com miomas e 9 mulheres hígdas. Esses autores encontraram uma diminuição do percentual das células NK nas pacientes com endometriose (Kikuchi *et al.*, 1993).

Assim, não existe consenso sobre a quantificação de células NK em relação aos linfócitos no sangue e líquido peritoneal. Por outro lado, a diminuição da atividade das células NK foi sistematicamente comprovada pelos estudos citados acima, assim como por outros estudos publicados (Kanzaki *et al.*, 1992; Hirata *et al.*, 1994). Os motivos da diminuição da

atividade citotóxica das células *NK* seriam uma expressão aumentada de receptores KIR inibitórios nas células *NK* (Maeda *et al.*, 2002), assim como um aumento da expressão de moléculas de CPH classe I no endométrio tópico e ectópico das pacientes com endometriose (Semino *et al.*, 1995) (Vernet-Tomas Mdel *et al.*, 2006).

Mais recentemente as células *NK* foram avaliadas em pacientes com endometriose, agora buscando utilizar ensaios que demonstrassem a diminuição da citotoxicidade como marcadores diagnósticos. Nesse sentido, foi realizado um estudo piloto que avaliou 58 portadoras de endometriose e 25 pacientes de um grupo controle; ao encontrar uma diminuição na produção da citocina interferon gama pelas células *NK* após exposição dessas ao soro de pacientes com endometriose, esses autores relataram que a diminuição da atividade das células *NK* poderia ser usada como ferramenta diagnóstica para endometriose sem calcular a acurácia desse método para o diagnóstico da endometriose (Bohler *et al.*, 2007).

### **Imunidade Humoral**

Nas portadoras de endometriose, paralelamente à diminuição da efetividade da resposta imune celular citotóxica (graças à diminuição da atividade de células *NK* e linfócitos T citotóxicos), parece ocorrer um aumento da atividade de linfócitos B, com conseqüente aumento de produção de auto-anticorpos (Yeaman *et al.*, 2002). Os dois primeiros estudos que observaram maior prevalência de anticorpos contra antígenos endometriais detectados no soro, líquido peritoneal, no tecido endometrial

tópico e ectópico portadores de endometriose pélvica foram realizados na década de 80 (Mathur *et al.*, 1982; Mathur *et al.*, 1988), demonstrando assim a participação da imunidade humoral na doença, tanto a nível local quanto sistêmico.

Em 1985, Grimes e colaboradores realizaram um interessante estudo caso-controle avaliando 109 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e 109 mulheres escolhidas randomicamente na instituição, sem diagnóstico de Lúpus. Esses autores descreveram um aumento de duas vezes no risco de desenvolver LES nas portadoras de endometriose, sem atingir significância estatística, além do fato de que as mulheres submetidas a histerectomia ou laqueadura tubária tinham um efeito protetor sobre o risco de desenvolvimento do LES; os autores indagaram assim a eventual participação da menstruação retrograda como co-fator de risco para o desenvolvimento de fenômenos auto-imunes como o LES (Grimes *et al.*, 1985).

Kennedy *et al.*, (1989) avaliaram 40 pacientes com endometriose e 65 pacientes presumidamente sem a doença (por não apresentarem sintomas), com objetivos de estudar a prevalência alguns auto-anticorpos; esses autores demonstraram maior prevalência de anticorpos anticardiolipina (IgG) nas portadoras de endometriose (7,5%) em relação ao grupo controle (nenhum caso). Não houve diferenças estatísticas relacionadas ao estadiamento da doença. Para isso, os autores estabeleceram que a amostra seria positiva se ultrapassasse 4 desvios padrão da média das cardiolipinas da população controle (Kennedy *et al.*, 1989). Esses resultados foram semelhantes aos publicados por outro grupo em 1991 (Kilpatrick *et al.*, 1991).

Outros anticorpos como anticorpos antinucleares (ANA), anticoagulante lúpico também foram encontrados em maior prevalência nas portadoras de endometriose (Kim *et al.*, 1997).

Ao avaliar 112 pacientes portadoras de endometriose operadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP), foi observada prevalência de 41% de positividade para ANA ( título de 1/80 ou mais). Esse estudo mostrou ainda não haver diferenças quanto ao estadiamento ou sintomas como infertilidade nas pacientes com endometriose na dependência da presença ou não desses auto-anticorpos, sugerindo que a presença desses auto-anticorpos seria um epifenômeno, sem relações com a gravidade da doença (Dias *et al.*, 2006).

Reações auto-imunes contra a glândula tireóide também foram estudadas nas pacientes com endometriose. A avaliação de anticorpos antitiroperoxidase (Ac Anti-TPO) de 438 pacientes inférteis por diferentes fatores foi comparada com a de 100 mulheres férteis com idade semelhante. Foram encontradas prevalências semelhantes desses auto-anticorpos nos dois grupos, no entanto, ao se dividir o grupo de pacientes inférteis segundo a causa da infertilidade, notou-se que o grupo de pacientes inférteis com endometriose apresentava prevalência estatisticamente superior desses anticorpos em relação ao grupo controle (29% x 8%,  $p=0,016$ ); esses autores demonstraram ainda que o risco relativo de uma paciente com infertilidade por endometriose apresentar positividade para o Ac anti-TPO era de 3.57, com intervalo de confiança variando de 1,09 a 11,8 (Pope *et al.*, 2002). Resultados semelhantes haviam sido publicados por (Gerhard *et*

*al.*, 1991), ao estudarem 185 pacientes inférteis nas quais avaliaram a presença de anticorpos antitiroglobulina (Ac Anti-TG) e de Ac Anti-TPO. Esses autores relataram uma prevalência de 44% de endometriose nas pacientes com presença desses auto-anticorpos, ao passo que apenas 8% das pacientes que apresentavam-se sem a presença desses tinham endometriose.

Por outro lado, em nosso país, pacientes com endometriose pélvica apresentaram prevalência de Ac anti-TPO e/ou Ac anti-TG semelhantes a um grupo controle. Essa conclusão foi obtida ao se estudar 148 pacientes com confirmação cirúrgica de endometriose, comparadas com 154 pacientes de um grupo controle. Vale ressaltar que o grupo controle desse estudo foi composto por pacientes sem sintomas de endometriose, que no entanto não foram submetidas a vídeo-laparoscopia para a efetiva exclusão da doença (Petta *et al.*, 2007).

Graças às publicações demonstrando maior prevalência de auto-anticorpos em pacientes com endometriose levantou-se duas hipóteses: a presença desse auto-anticorpos seria um epifenômeno ou a endometriose seria uma doença auto-imune por apresentar uma série de características comuns a este tipo de doença como ativação policlonal de células B, anormalidades imunológicas nas funções das células T e B, dano tecidual, envolvimento de diversos órgãos, possível ocorrência familiar com base genética associada além da presença de uma série de auto-anticorpos para uma variedade de fosfolípidos, histonas e polinucleotídeos (Gleicher *et al.*, 1987). No entanto, até os dias atuais, nenhum auto-anticorpo conseguiu ser evidenciado como

marcador específico para endometriose, além de nenhum estudo ter provado a manifestação da endometriose em animais normais após transferência de imunoglobulinas séricas ou tecidos afetados de cobaias doentes, o que definiria uma doença auto-imune real (Nothnick, 2001).

Com base nestas informações, o que permitiria o implante de endométrio na cavidade peritoneal das portadoras de endometriose, seria a diminuição do poder de citotoxicidade das células NK contra esse tecido ectópico. Esse fato estaria associado a um processo inflamatório, com alterações no padrão de secreção de algumas citocinas, e paralelamente a isso, as pacientes com endometriose pélvica demonstrariam maior produção de auto-anticorpos. Assim, o presente estudo se propõe a avaliar de maneira conjunta a prevalência de auto-anticorpos e a concentração de células NK no sangue periférico, avaliando assim fenômenos imunológicos sistêmicos relacionados à endometriose e a eventual utilização desses fenômenos como marcadores diagnósticos de endometriose em suas diversas apresentações.

## **2 OBJETIVOS**

---

### **2.1 Principal**

Avaliar no sangue periférico o percentual de células NK em relação ao número total de linfócitos e a presença de anticorpos antinucleares, antitiroglobulina, antitiroperoxidase, anticardiolipinas (IgG, IgM, IgA) e antifosfatidilserina (IgG, IgM e IgA) em pacientes com e sem endometriose .

### **2.2 Secundários**

2.2.1) Relacionar em pacientes com e sem endometriose, as dosagens séricas das células NK e a presença dos auto-anticorpos acima citados com:

- estadiamento da American Society for Reproductive Medicine (ASRM, 1997)
- locais de acometimento da endometriose;
- classificação histológica da endometriose;

2.2.2) avaliar a aplicação da dosagem destas substâncias no diagnóstico da endometriose.

### **3 MÉTODOS**

---

Realizamos um estudo transversal, avaliando 155 pacientes consecutivas submetidas a videolaparoscopia no período de dezembro de 2004 a dezembro de 2007, as quais foram divididas em grupo com (n=100) e sem (n=55) endometriose pélvica.

Em decorrência das diversas avaliações a que nos propusemos no presente estudo, além da discrepância nos resultados encontrados na literatura, optamos por realizar um estudo exploratório no qual o total de pacientes participantes foi determinado baseando-se na possibilidade de realizar esse número de procedimentos cirúrgicos no período do trabalho. Ao final do estudo calculamos o poder estatístico da amostra para os resultados encontrados.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 1) e todas as pacientes leram e assinaram o termo de consentimento pós-informação (Anexo 2). A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) possibilitou a realização do presente estudo (Processo 05/01218-3).

### 3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para o grupo de pacientes com endometriose foram: idade entre 18 e 40 anos; confirmação histológica da doença nos espécimes obtidos durante a cirurgia. Para o grupo controle, os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 40 anos e ausência de confirmação laparoscópica ou anatomopatológica (quando realizada biópsia de lesão suspeita) de endometriose.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: presença de diagnóstico de neoplasias malignas; presença de doenças auto-imunes conhecidas; diagnóstico de processos infecciosos nos 3 meses antecedentes ao procedimento cirúrgico; sinais clínicos ou laboratoriais de insuficiência ovariana; utilização de terapêutica hormonal nos 3 meses antecedentes ao procedimento cirúrgico (análogos mensais do GnRH, progestógenos e contraceptivos hormonais) ou utilização de análogos trimestrais do GnRH nos 6 meses antecedentes ao procedimento.

Doenças neoplásicas, infecciosas ou auto-imunes foram excluídas por anamnese dirigida e quando necessários, exames de imagem ou laboratoriais foram utilizados.

### 3.2 Dinâmica do estudo

A **figura 2** esquematiza a dinâmica do estudo. Inicialmente 167 pacientes foram avaliadas e tiveram história clínica, exame físico, e exames complementares (ultrassonografia pélvica e /ou transvaginal com preparo intestinal, ressonância magnética ou ecocolonosopia) realizados conforme indicação clínica. Tal rotina obedecia à propedêutica clínica para suspeita de endometriose e indicação de vídeo-laparoscopia realizadas no Setor de Endometriose do HCFMUSP. A vídeo-laparoscopia foi indicada em pacientes sintomáticas (dor e/ou infertilidade) quando a paciente apresentava índices de CA 125 superiores a 100 U/ml ou método de imagem (ultrassom ou ressonância magnética) sugestivos de endometriose, na forma de endometriomas ovarianos ou doença profunda. Nas pacientes com dor, o procedimento cirúrgico também foi indicado mesmo na ausência dos fatores citados acima, naqueles casos em que essas pacientes não apresentassem melhora dos sintomas após seis meses de tentativas de tratamento clínico com uso de contraceptivos hormonais orais combinados e/ou antiinflamatórios.

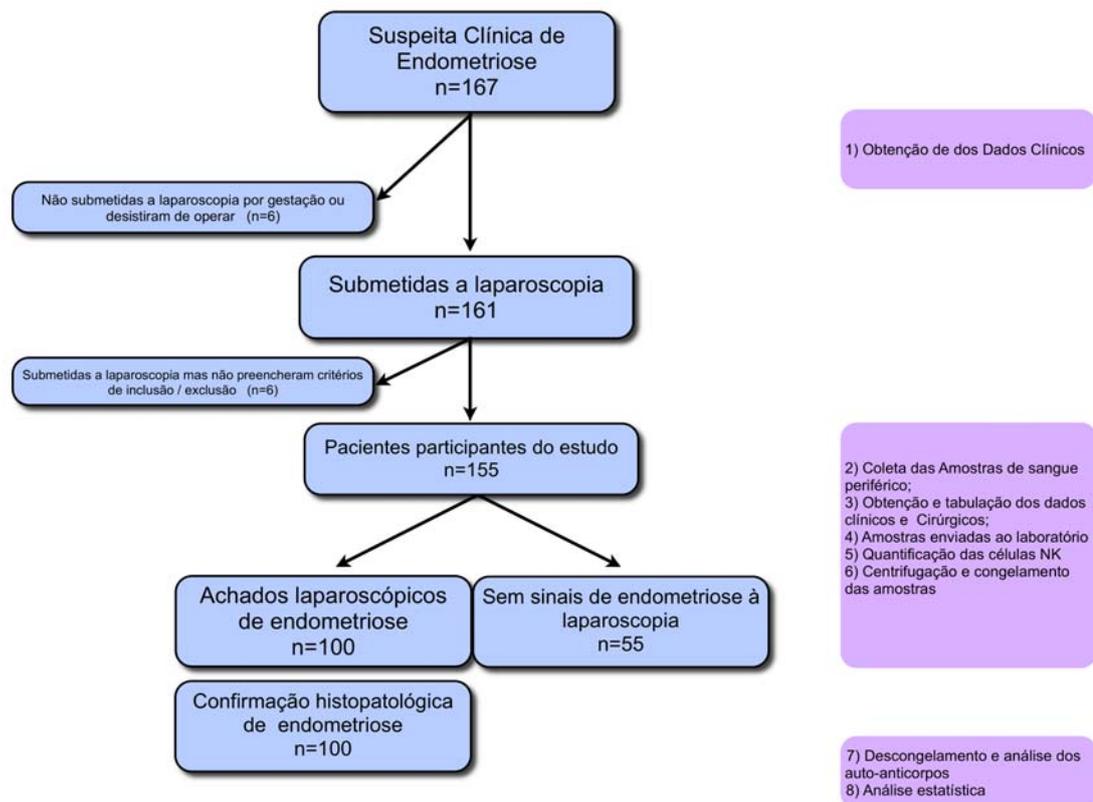
Dessas 167 pacientes, quatro não foram submetidas a videolaparoscopia por razões pessoais (desistiram de operar) e duas por terem engravidado. Foram então submetidas a videolaparoscopia 161 pacientes, das quais 6 foram excluídas por não preencherem os critérios de inclusão ou exclusão (3 por idade superior a 40 anos, 2 por terem referido febre (temperatura  $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ ) nas semanas anteriores ao procedimento

cirúrgico, 1 por apresentar sinais de salpingite aguda, com exsudato purulento perianexial).

Imediatamente antes da anestesia, foram colhidos 15ml de sangue periférico que foram distribuídos em um tubo seco e em um tubo contendo EDTA (ácido etilenediaminotetraacético). A paciente foi submetida à laparoscopia, seguindo a rotina habitual do serviço e nessa data foi anotado o dia do ciclo menstrual em que a paciente se encontrava.

A laparoscopia separou os dois grupos de estudo: o **grupo com endometriose**, com confirmação histológica das amostras teciduais das áreas suspeitas, e o **grupo controle** no qual descartou-se a presença dessa doença.

Ambos os tubos foram imediatamente transportados para o laboratório onde a determinação da concentração das células *Natural Killer* (NK) foi realizada no mesmo dia da cirurgia no material transportado no tubo com EDTA. O restante do material (tubo seco) foi centrifugado, aliquotado e congelado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Depois de estocado, o mesmo foi descongelado apenas após a coleta completa de todos os dados, para realização das dosagens de ANA, Ac Anti-TG, Ac anti-TPO, anticorpos anticardiolipina IgG, IgM e IgA (aCL-G, aCL-M, aCL-A) e anticorpos antifosfatidilserina IgG, IgM e IgA (aPS-G, aPS -M, aPS -A).



**Figura 2 - Dinâmica do estudo**

### 3.3 Quadro clínico

As pacientes foram questionadas quanto à presença dos sintomas mais comumente associados a endometriose, tais como:

- a. Dismenorréia: dor em cólica no período menstrual, conforme classificação abaixo (Eskenazi *et al.*, 2001)
  - Leve, quando a paciente referiu dor que melhorou sem utilização de medicação analgésica;

- Moderada, quando a paciente referiu dor que melhorou com uso de analgésicos;
- Severa, quando a paciente referiu que a dor não melhorou completamente com analgésicos, mas não a impediu de exercer suas atividades habituais;
- Incapacitante, quando a paciente referiu que a dor não melhorou e a impediu de exercer suas atividades habituais.

Para melhor avaliação das pacientes com sintomas mais significativos, consideramos a dismenorréia de intensidade severa ou incapacitante.

- b. Dispareunia de profundidade: dor pélvica e/ou relatada como localizada no fundo da vagina que ocorresse durante a relação sexual,
- c. Dor pélvica acíclica: dor pélvica sem relação com o ciclo menstrual por pelo menos seis meses, sem melhora com a utilização de analgésicos.
- d. Infertilidade: tentativa de engravidar em casal possuindo vida sexual ativa sem utilizar método contraceptivo por pelo menos um ano. Pacientes sem parceiros sexuais no momento do estudo ou que nunca haviam tentado engravidar, ou que porventura

estivessem usando métodos contraceptivos naturais ou de barreira foram classificadas como “sem tentativa”.

- e. Sintomas intestinais cíclicas: dor à evacuação, incluindo puxo ou tenesmo ou ainda sangramento nas fezes durante o período menstrual.
- f. Sintomas urinários cíclicos: sintomas urinários durante o período menstrual incluindo disúria, hematúria, polaciúria e urgência miccional.

### **3.4 Estadiamento da Endometriose**

As pacientes com endometriose foram estadiadas durante o procedimento cirúrgico pelo critério da American Society for Reproductive Medicine revisado em 1996 em estádios de I a IV (**Figura 3**) (ASRM, 1997).

Estádio I (mínima): 1-5

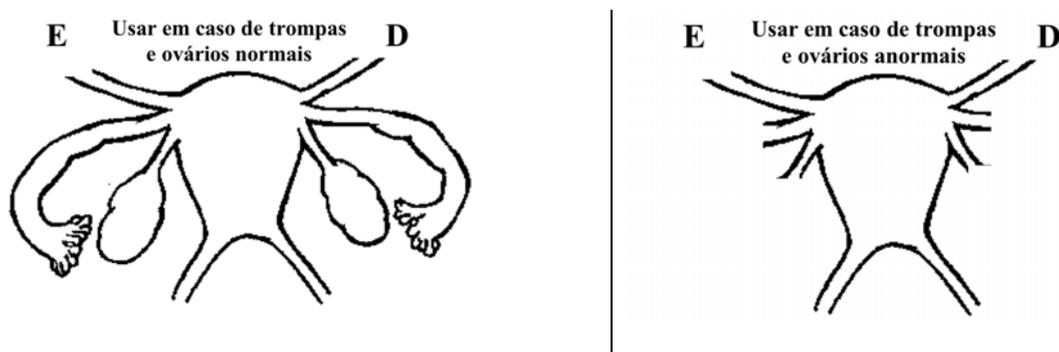
Estádio II (leve): 6-15

Estádio III (moderada): 16-40

Estádio IV (severa): &gt; 40

|  |               |                 |                      |                  |
|--|---------------|-----------------|----------------------|------------------|
| PERITÔNIO                              | ENDOMETRIOSE  | < 1 cm          | 1-3 cm               | > 3 cm           |
|  | Superficial   | 1               | 2                    | 4                |
|  | Profunda      | 2               | 4                    | 6                |
| OVÁRIO                                 | D superficial | 1               | 2                    | 4                |
|  | Profunda      | 4               | 16                   | 20               |
|  | E superficial | 1               | 2                    | 4                |
|  | Profunda      | 4               | 16                   | 20               |
| OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR |               | Parcial         |                      | Completa         |
|  |               | 4               |                      | 40               |
| OVÁRIO                                 | ADERÊNCIAS    | < 1/3 Envolvido | 1/3 - 2/3 Envolvidos | > 2/3 Envolvidos |
|  | D Velamentosa | 1               | 2                    | 4                |
|  | Densa         | 4               | 8                    | 16               |
|  | E Velamentosa | 1               | 2                    | 4                |
|  | Densa         | 4               | 8                    | 16               |
|  | TROMPA        | D Velamentosa   | 1                    | 2                |
|  | Densa         | 4*              | 8*                   | 16               |
|  | E Velamentosa | 1               | 2                    | 4                |
|  | Densa         | 4*              | 8*                   | 16               |

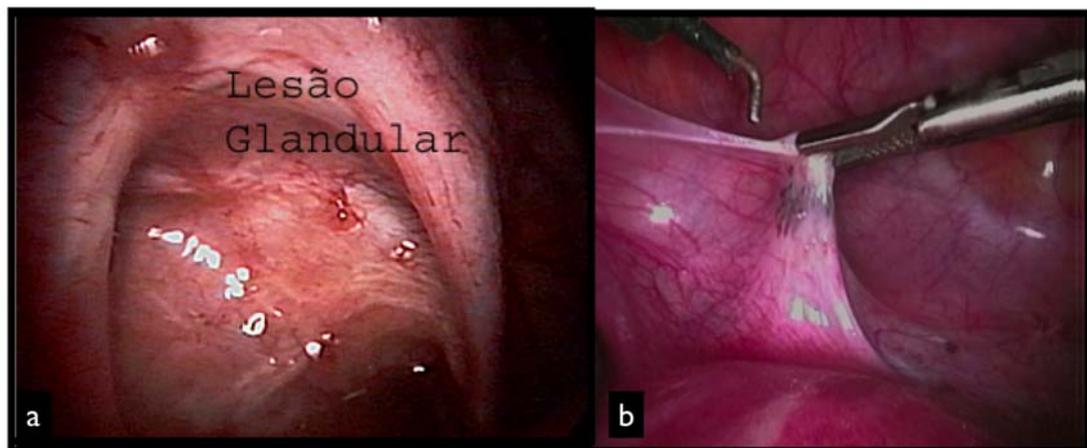
\* Se as fímbrias tubárias estiverem totalmente envolvidas por aderências, mude o escore para 16.



**Figura 3 - Classificação da American Society for Reproductive Medicine revisada em 1996, extraída do texto original**

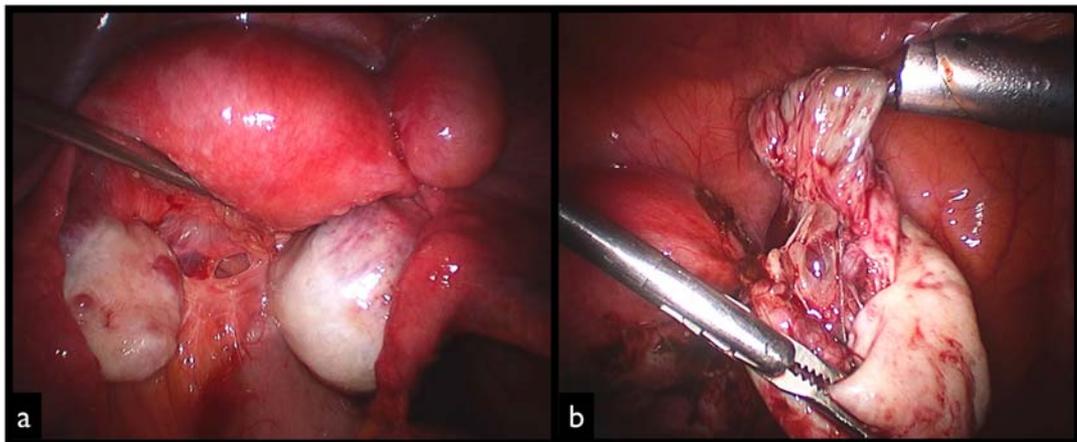
### 3.5 Endometriose: locais de doença e classificação histológica

As pacientes com endometriose foram avaliadas quanto a presença de focos de doença em peritônio, ovário e/ou em localização infiltrativa profunda (nas regiões retrocervical, cúpula vaginal, retossigmóide, ureteres e bexiga e outras porções do tubo digestivo, como íleo e apêndice), conforme podemos observar exemplos nas figuras 4, 5 e 6.



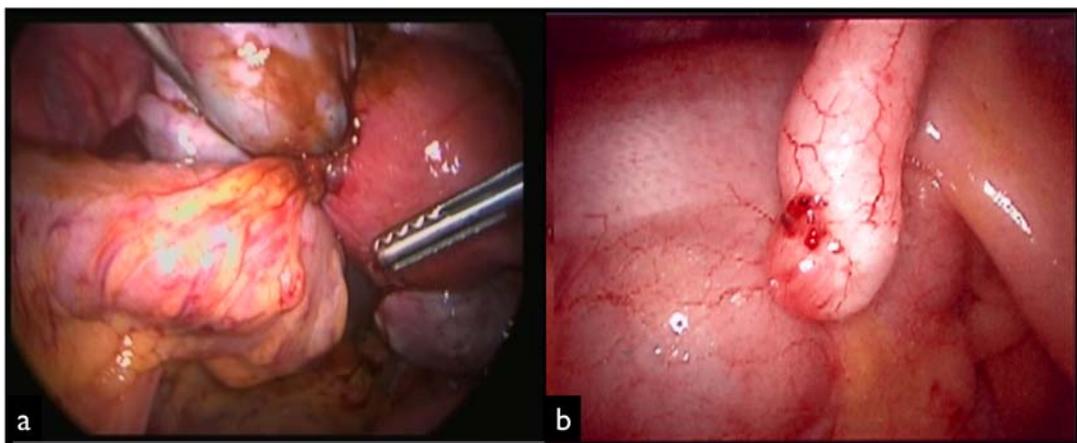
a - Foto de videolaparoscopia em paciente com endometriose peritoneal superficial em ligamento útero-sacro esquerdo;  
b) exérese de lesão peritoneal superficial em reflexão vésico-uterina.

**Figura 4 - Fotos de videolaparoscopia em pacientes com endometriose peritoneal superficial**



a - Foto de videolaparoscopia em paciente com endometrioma ovariano bilateral e bloqueio parcial de fundo de saco posterior; b) exérese de endometrioma ovariano.

**Figura 5 - Fotos de laparoscopia em pacientes com endometriomas ovarianos**

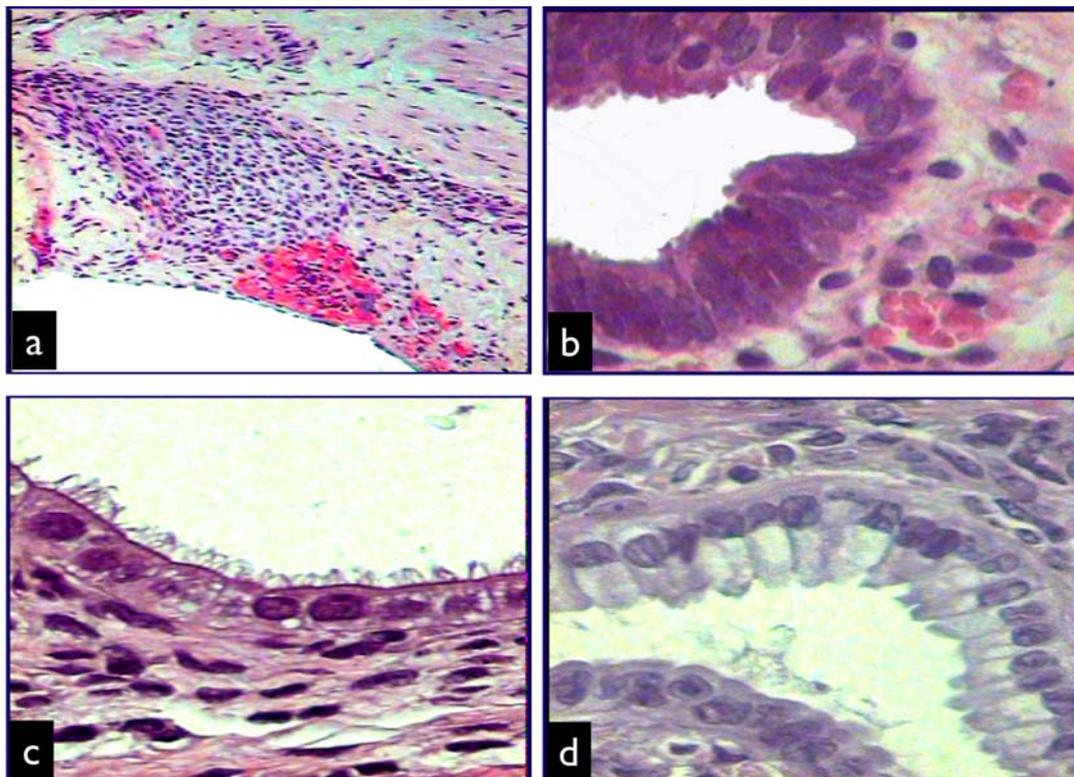


a - Foto de videolaparoscopia em paciente com bloqueio parcial de fundo-de-saco posterior por endometriose profunda de retossigmóide associada a endometrioma ovariano; b) endometriose de apêndice.

**Figura 6 - Fotos de laparoscopia em pacientes com endometriose profunda intestinal**

A análise histológica dos tecidos excisados seguiu os padrões da classificação (Abrao *et al.*, 2003) que divide a doença em:

- padrão estromal: presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio tónico em qualquer fase do ciclo (Figura 7a);
- padrão glandular bem diferenciado: quando o epitélio glandular era composto por células epiteliais com morfologia indistinguível dos endométrios tónicos nas diferentes fases do ciclo menstrual (Figura 7b);
- padrão glandular indiferenciado: presença de epitélio glandular sem as características morfológicas vistas no epitélio endometrial tónico (Figuras 7c e 7d);
- padrão glandular misto de diferenciação: presença na mesma localização de epitélios de padrão bem diferenciado e indiferenciado.



Fotomicrografia óptica corada com hematoxilina e eosina de espécimes de endometriose: a) endometriose com padrão histológico estromal, com aumento de 100x; b) endometriose com padrão histológico bem-diferenciado, com aumento de 400; c) endometriose com padrão histológico indiferenciado ( padrão seroso), com aumento de 400 ; d) endometriose com padrão histológico indiferenciado ( padrão mucinoso), com aumento de 400x.

### Figura 7 - Fotomicrografias ópticas de espécimes com endometriose

Para análise estatística, os locais de doença foram categorizados, em **doença peritoneal** (pacientes com focos peritoneais superficiais, sem doença ovariana ou profunda), **ovariana** (pacientes com endometriomas ovarianos, independentemente da presença de focos peritoneais superficiais e sem doença profunda) e **doença profunda** (pacientes com focos classificados como profundos, independentemente da presença ou ausência de focos peritoneais superficiais ou endometriomas ovarianos. O tipo histológico foi dividido em dois grupos para a realização da análise

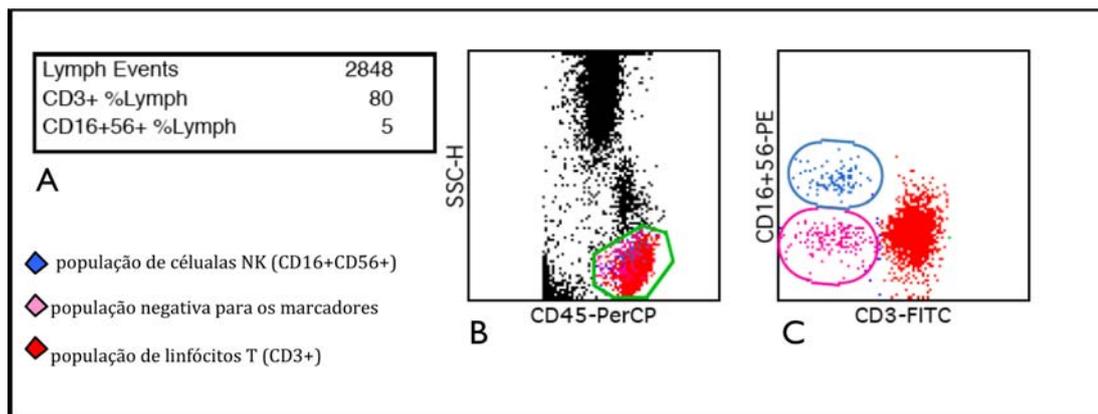
estatística: **endometriose com indiferenciação**, quando qualquer dos focos apresentava tipo histológico indiferenciado ou misto; e **endometriose sem indiferenciação**, quando em nenhum dos focos foi encontrado os tipos histológicos indiferenciado ou misto.

### **3.6 Método laboratorial**

#### **3.6.1 Células NK**

A identificação e quantificação do percentual das células NK foi realizada no dia da cirurgia, logo no momento do recebimento do material através de citometria de fluxo no tubo com EDTA. Antes da análise do percentual de células NK obteve-se a quantificação total e diferencial dos leucócitos utilizando metodologia automatizada (Sysmex SF3000 – Roche Diagnosticos®, Brasil), obtendo-se assim o número absoluto de leucócitos assim como os linfócitos. Após adicionarmos o sangue ao reagente comercialmente obtido, chamado BD TriTEST CD3 FITC / CD16+56 PE / CD45 PerCP (BECTON DICKINSON®, San Diego, Califórnia, Estados Unidos), com isso, os anticorpos do kit comercial marcados com fluorescência aderem-se aos antígenos específicos de membrana das células da amostra a ser estudada e ao se avaliar a amostra, o citômetro de fluxo obtém o percentual de células marcadas por fluorescência. As células NK foram caracterizadas conforme seus antígenos de superfície como

(CD3-/CD56+/CD16+) (Figura 8). O citometro de fluxo utilizado foi o **FACSCalibur®** (BECTON DICKINSON®, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Quanto aos resultados obtidos, utilizamos para esse estudo o percentual de células NK obtidos entre os linfócitos.



**Legenda: Figura 8A:** Total de linfócitos analisados em 10.000 eventos, porcentagem de linfócitos T e porcentagem de cél. NK. **Figura 8B:** População de linfócitos. **Figura 8C:** Separação dos linfócitos conforme legenda de cores

**Figura 8 - Laudo ilustrativo emitido após citometria de fluxo para quantificação de células Natural Killer em citômetro de fluxo FACSCalibur®**

### 3.6.2 Auto-Anticorpos

Todos os auto-anticorpos foram avaliados em conjunto ao final do estudo. A avaliação do ANA foi realizado por imunofluorescência indireta (IFI), utilizando células HEp-2 como substrato (Hemagen®, Columbia, Maryland, Estados Unidos). A imunofluorescência é um método que permite a localização de um antígeno utilizando um anticorpo marcado com uma

molécula fluorescente. Microscópios equipados com luz ultravioleta são utilizados para visualização dos anticorpos fluorescentes presentes no espécime. Numa primeira etapa ocorre reação entre a amostra da paciente e um anticorpo específico não marcado, em seguida adiciona-se uma anti-imunoglobulina marcada com um grupo fluorescente, a qual mostrará à microscopia a existência dos auto-anticorpos. Foram consideradas “positivas” amostras com títulos de ANA iguais ou superiores à titulação de 1/80 (Adams e Mutasim, 2000).

A detecção dos auto-anticorpos circulantes do tipo IgG, IgM e IgA dirigidos contra a cardiolipina e fosfatidilserina foi realizada por teste ELISA, técnica de ensaio imunoenzimático quantitativo tipo sanduíche. As placas onde os antígenos de cardiolipina e fosfatidilserina foram desenvolvidas segundo metodologia previamente descrita (Canoso e de Oliveira, 1988).

Foram realizadas diluições das amostras a 1/51 (10µl da amostra/ 500 µl do diluente). As microcavidades de placas contendo antígenos específicos (CL e FS) foram adicionados 100 µl de cada amostra. Nas amostras com anticorpos presentes, estes ligavam-se aos antígenos presentes nas placas. Estas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente (20 a 25°C). Procederam-se a quatro lavagens da placa com solução de lavagem e transferiram-se 100 µl de conjugado Anti-IgG ou IgM ou IgA (anti-anticorpo específico), utilizando-se pipetador multicanal. As placas foram novamente incubadas por um período de 30 minutos e novamente lavadas. Foram adicionados 100 µl de Tetrametilbenzidina (TMB-substrato que dá cor à reação) a cada cavidade das placas, seguindo-se de incubação por 10

minutos. Foi adicionado ácido sulfúrico 1N (50 µl) a cada cavidade para a parada da reação enzimática. A leitura foi realizada imediatamente em um leitor de microplacas a 450 nm. A intensidade da cor está relacionada à quantidade de anticorpos presentes na amostra. Para avaliação estatística de todas as cardiolipinas e fosfatidilserinas, consideramos como positivos os concentrações acima de 40 GPL, MPL e APL para IgG, IgM e IgA respectivamente (Miyakis *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que também foram feitas avaliações para esses anticorpos utilizando como critério de positividade amostras acima do percentil 99, assim como a comparação das medianas e todas as avaliações apresentaram resultados semelhantes. Optamos por demonstrar apenas os valores como positivo ou negativo na dependência dos resultados apresentarem-se maiores ou menores que 40.

Anticorpos antitiroglobulina (Anti-TG) e antitiroperoxidase (Anti-TPO) foram avaliados através da técnica de eletroquimioluminescência utilizando-se kits comerciais com antígenos recombinantes e anticorpos monoclonais (Roche Diagnosticos®, Brasil). Resumidamente, partículas magnéticas revestidas com estreptavidina são utilizadas como fase sólida. O primeiro reagente consiste de tiroglobulina ou peroxidase ligados à biotina. Após adição do soro do paciente, os anticorpos são revelados utilizando-se anti-imunoglobulina humana e revelados por eletroquimioluminescência. Conforme recomendações do fabricante, foram considerados positivos anticorpos anti-TG com concentrações acima de 115 UI/ml. Para anticorpos anti-TPO, foram consideradas amostras positivas no caso de concentrações acima de 34 UI/ml.

### 3.7 Método estatístico

As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%, considerando dois grupos inicialmente para comparação: grupo controle (sem endometriose) e grupo com endometriose. Quanto às variáveis quantitativas contínuas, foi realizada a comparação das concentrações das células NK entre os dois grupos em estudo, pelo teste t de Student para amostras independentes, com nível de significância de 5%. As pacientes com endometriose foram categorizadas de acordo com o estágio e local da doença e de acordo com a classificação histológica. Para essas comparações, foi realizada análise de variância (Anova) e, quando significativo, foi realizado o teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Bonferroni, para verificar se as dosagens no soro foram semelhantes ou diferentes, alternativamente.

As variáveis que apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos pesquisados, foram então estudadas com objetivos de utilização como marcadores diagnósticos. Nesse sentido, nas variáveis qualitativas avaliamos a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. A relação de sensibilidade e especificidade foi avaliada através de curva ROC (*receiver operator characteristic*) para o percentual de células NK. Finalmente realizamos uma regressão logística com as variáveis que apresentaram significância estatística para tentar se obter um modelo para detecção de endometriose.

Os cálculos estatísticos foram realizados pelo software SPSS (SPSS Inc<sup>®</sup>, USA).

## 4 RESULTADOS

---

Foram estudadas 155 mulheres, sendo 100 com endometriose (casos) e 55 sem endometriose (controles). A média de idade das pacientes com endometriose foi 32,0 ( $\pm 5,5$ ) anos, semelhante ao grupo controle, com média igual a 32,5 ( $\pm 5,0$ ) anos ( $p=0,582$ ). Na **tabela 1** mostramos as características clínicas das pacientes estudadas. Nota-se que as pacientes do grupo com endometriose apresentavam mais dismenorréia, dispareunia de profundidade, infertilidade e sintomas intestinais cíclicos ( 66%, 58%, 63% e 48%) que as do grupo controle ( 27,3%, 38,2%, 22,4%, 7,3%), com diferenças estatisticamente significativas. As pacientes com endometriose também tiveram um número médio menor de gestações e partos prévios em relação às do grupo controle.

**Tabela 1** - Características clínicas das pacientes estudadas

| Característica clínica  | Casos<br>(n=100) | Controles<br>(n=55) | p      |
|---|------------------|---------------------|--------|
| Idade (média ± DP) (anos)                                       | 32,0 (±5,5)      | 32,5 (±5,0)         | 0,582  |
| Fase do Ciclo   |                  |                     |        |
| - Proliferativa (1 <sup>o</sup> –14 <sup>o</sup> dias do ciclo) | 76 (76,0%)       | 37 (67,3%)          |        |
| - Secretora (15 <sup>o</sup> – 30 <sup>o</sup> dias do ciclo)   | 24 (24,0%)       | 18 (32,7%)          | 0,242  |
| Dismenorréia severa / incapacitante                             | 66 (66,0%)       | 15 (27,3%)          | <0,001 |
| Dispareunia de profundidade                                     | 58 (58,0%)       | 21 (38,2%)          | 0,018  |
| Dor pélvica acíclica  | 44 (44,0%)       | 17 (30,9%)          | 0,110  |
| Infertilidade *   | 41 (63,1%)       | 11 (22,4%)          | <0,001 |
| Tempo de Infertilidade (anos) (média ± DP)                      | 2,87 (1,73)      | 2,18 (0,60)         | 0,205  |
| Sintomas Intestinais Cíclicos                                   | 48 (48,0%)       | 7,3% (4)            | <0,001 |
| Sintomas Urinários Cíclicos                                     | 4 (4,0%)         | 2 (3,6%)            | 1,000  |
| Número de gestações prévias (média ± DP)                        | 0,54(0,91)       | 1,82(1,67)          | <0,001 |
| Número de partos prévios (média ± DP)                           | 0,39(1,53)       | 0,72(1,56)          | <0,001 |
| Número de abortos prévios (média ± DP)                          | 0,15(0,41)       | 0,18(0,39)          | 0,639  |

\* 114 pacientes estavam tentando engravidar, 65 do grupo com endometriose e 49 do grupo controle

Na **tabela 2** observamos os achados cirúrgicos das pacientes do grupo com endometriose, das quais 61% foram classificadas como estádios avançados (III e IV). A predominância de mulheres com doença mais grave pode ainda ser notada pelo fato de 66% delas apresentarem doença profunda e 72% com classificação histológica de doença indiferenciada.

**Tabela 2** - Achados cirúrgicos e histopatológicos das pacientes com endometriose

| <b>Característica estuda</b>        | <b>n (%)</b> |
|-------------------------------------|--------------|
| <b>Estadiamento (ASRM 1996)</b>     |              |
| Inicial: I/II                       | 39 (39)      |
| Avançada: III/IV                    | 61 (61)      |
| <b>Locais de Doença</b>             |              |
| Endometriose Peritoneal Superficial | 14 (14)      |
| Endometrioma Ovariano               | 20 (20)      |
| Endometriose Profunda               | 66 (66)      |
| - Retrocervical + Cúpula Vaginal    | 53 (53)      |
| - Retossigmóide                     | 41 (41)      |
| - Ureter                            | 8 ( 8)       |
| - Bexiga                            | 7 ( 7)       |
| - Apêndice                          | 6 ( 6)       |
| - Íleo                              | 2 ( 2)       |
| <b>Classificação Histológica</b>    |              |
| - Endometriose sem Indiferenciação  | 28 (28)      |
| - Endometriose com Indiferenciação  | 72 (72)      |

Na **tabela 3** comparamos os percentuais das células NK, assim como a prevalência dos auto-anticorpos estudados nos dois grupos. Pacientes com endometriose apresentaram percentual de células NK de  $15,3 \pm 9,8\%$ , enquanto as do grupo controle apresentavam percentual de  $10,6 \pm 5,8$ ,  $p < 0,001$ . Quanto aos auto-anticorpos, as pacientes com endometriose apresentaram prevalência de auto-anticorpos contra cardiolipina, fosfatidilserina, tiroglobulina e tiroperoxidase semelhantes em ambos os grupos estudados. Já a prevalência de ANA foi estatisticamente superior nas pacientes com endometriose ( 33/100, 33%) em relação ao grupo controle (7/55, 12,7%), com  $p = 0,006$ .

**Tabela 3** - Dosagem de células NK e auto-anticorpos nas pacientes com e sem endometriose

|                                     | Endometriose<br>n=100 | Controle<br>n=55 | p      |
|-------------------------------------|-----------------------|------------------|--------|
| % de Células NK - (média $\pm$ DP)  | 15,3 $\pm$ 9,8        | 10,6 $\pm$ 5,8   | <0,001 |
| ANA Positivo n(%)                   | 33 (33%)              | 7 (12,7%)        | 0,006  |
| Ac-TG Positivo - n(%)               | 15 (15%)              | 6 (10,9%)        | 0,640  |
| Ac-TPO Positivo - n(%)              | 18 (18%)              | 11 (20%)         | 0,760  |
| Ac-TPO e / ou Ac-TG Positivo - n(%) | 24 (24%)              | 13 (23,6%)       | 0,959  |
| Ac-aCL IgG Positivo - n(%)          | 3 (3,0%)              | 1 (1,8%)         | 0,554  |
| Ac-aCL IgM Positivo - n(%)          | 0                     | 0                |        |
| Ac-aCL IgA Positivo - n(%)          | 5 (5,0%)              | 1 (1,8%)         | 0,305  |
| Ac-aPS IgG Positivo - n(%)          | 1 (1,0%)              | 0                | 1,000  |
| Ac-aPS IgM Positivo - n(%)          | 0                     | 0                |        |
| Ac-aPS IgA Positivo - n(%)          | 3 (3,0%)              | 0                | 0,309  |

**ANA Positivo:** Títulos  $\geq$  1/80; **Ac-TG Positivo:** concentrações  $\geq$  115 UI/ml; **Ac-TPO Positivo:** concentrações  $\geq$  34 UI/ml;  
**Ac-aCL, Ac-aPS Positivo:** IgG  $>$ 40 GPL ; IgM  $>$ 40 MPL ; IgA  $>$ 40 APL.

A **tabela 4** ilustra a relação entre a fase do ciclo menstrual e as características pesquisadas no sangue periférico. Como podemos observar, não houve influências nas dosagens das células NK, assim como na prevalência de auto-anticorpos relacionadas à fase do ciclo no dia da coleta da amostra nas pacientes com ou sem endometriose.

**Tabela 4** - Achados Laboratoriais das pacientes divididas conforme a fase do ciclo menstrual

|                                     | Endometriose           |                         |       | Controle               |                         |       |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------|------------------------|-------------------------|-------|
|                                     | 1° – 14° dias do ciclo | 15° – 30° dias do ciclo | p*    | 1° – 14° dias do ciclo | 15° – 30° dias do ciclo | p**   |
| n                                   | 24                     | 76                      |       | 18                     | 37                      |       |
| % de Células NK - (média ± DP)      | 15,3±10,4              | 14,5 ±9,7               | 0,961 | 9,1±3,1                | 11,3 ±6,7               | 0,566 |
| ANA Positivo n(%)                   | 6 (25,0%)              | 27 (35,5%)              | 0,339 | 1 (5,6%)               | 6 (16,2%)               | 0,457 |
| Ac-TG Positivo - n(%)               | 4 (16,7%)              | 11 (14,5%)              | 0,180 | 3 (16,7%)              | 3 (8,1%)                | 0,381 |
| Ac-TPO Positivo - n(%)              | 5 (20,8%)              | 13 (17,1%)              | 0,104 | 5 (27,8%)              | 6 (16,2%)               | 0,315 |
| Ac-TPO e / ou Ac-TG Positivo - n(%) | 6 (25%)                | 18 (23,7%)              | 0,347 | 3 (33,3%)              | 7 (18,9%)               | 0,238 |
| Ac-aCL IgG Positivo - n(%)          | 1 (4,2%)               | 2 (2,6%)                | 0,565 | 0                      | 1 (2,7%)                | 1,000 |
| Ac-aCL IgM Positivo - n(%)          | 0                      | 0                       |       | 0                      | 0                       |       |
| Ac-aCL IgA Positivo - n(%)          | 1 (4,2%)               | 4 (5,3%)                | 1,000 | 0                      | 1 (2,7%)                | 1,000 |
| Ac-aPS IgG Positivo - n(%)          | 0                      | 1 (1,3%)                | 1,000 | 0                      | 0                       |       |
| Ac-aPS IgM Positivo - n(%)          | 0                      | 0                       |       | 0                      | 0                       |       |
| Ac-aPS IgA Positivo - n(%)          | 0                      | 3 (3,9%)                | 1,000 | 0                      | 0                       |       |

**ANA Positivo:** Títulos  $\geq 1/80$ ; **Ac-TG Positivo:** concentrações  $\geq 115$  UI/ml; **Ac-TPO Positivo:** concentrações  $\geq 34$  UI/ml; **Ac-aCL, Ac-aPS Positivo:** IgG  $>40$  GPL ; IgM  $>40$  MPL ; IgA  $>40$  APL

\* Comparação nas pacientes com endometriose ; \*\* Comparação nas pacientes sem endometriose

Prosseguindo a avaliação das pacientes com endometriose, esse grupo foi subdividido conforme o estadiamento, os locais comprometidos pela doença e a classificação histológica, tentando identificar um subgrupo de pacientes no qual as alterações detectadas acima foram mais importantes. Na **tabela 5**, observamos as pacientes do grupo com endometriose divididas quanto ao estadiamento. Nota-se que o percentual de células NK elevou-se no grupo com endometriose predominantemente em decorrência das pacientes com doença avançada. No grupo controle (n=55) o percentual de células NK encontrado foi de  $10,6 \pm 5,8\%$ , nas pacientes com endometriose inicial (n=39)  $11,8 \pm 7,3\%$  e nas com endometriose avançada (n=61) o percentual foi de  $17,8 \pm 10,6\%$ ,  $p=0,001$ . As pacientes em endometriose avançada mostraram níveis de NK superiores tanto ao grupo controle quanto ao grupo com doença inicial ( $p<0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos com endometriose inicial e controle quanto às células NK.

Quanto ao ANA, notamos aumento da prevalência desse auto-anticorpo tanto nas pacientes com doença inicial (13/39; 33%) como naquelas com doença avançada (20/61; 32,8%) em relação ao grupo controle (7/55; 12,7%),  $p=0,022$ . Não houve diferenças na prevalência dos outros auto-anticorpos estudados quando o grupo endometriose foi dividido em doença inicial e avançada.

**Tabela 5** - Dosagem de células NK e auto-anticorpos nas pacientes sem e com endometriose, divididas conforme o estadiamento

|                                     | Controle<br>(n=55) | Endometriose<br>Inicial<br>(n=39) | Endometriose<br>Avançada<br>(n=61) | P      |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------|
| % de Células NK - (média ± DP)      | 10,6±5,8           | 11,8 ±7,3                         | 17,8±10,6                          | <0,001 |
| ANA Positivo - n(%)                 | 7 (12,7%)          | 13 (33,3%)                        | 20 (32,8%)                         | 0,022  |
| Ac-TG Positivo - n(%)               | 6 (10,9%)          | 7 (17,9%)                         | 8 (13,1%)                          | 0,747  |
| Ac-TPO Positivo - n(%)              | 11 (20%)           | 7 (17,9%)                         | 11 (18,0%)                         | 0,954  |
| Ac-TPO e / ou Ac-TG Positivo - n(%) | 13 (23,6%)         | 10 (25,6%)                        | 14 (23,0%)                         | 0,953  |
| Ac-aCL IgG Positivo - n(%)          | 1 (1,8%)           | 0                                 | 3 (4,9%)                           | 0,453  |
| Ac-aCL IgM Positivo - n(%)          | 0                  | 0                                 | 0                                  |        |
| Ac-aCL IgA Positivo - n(%)          | 1 (1,8%)           | 0                                 | 5 (8,2%)                           | 0,092  |
| Ac-aPS IgG Positivo - n(%)          | 0                  | 0                                 | 1 (1,6%)                           | 1,000  |
| Ac-aPS IgM Positivo - n(%)          | 0                  | 0                                 | 0                                  |        |
| Ac-aPS IgA Positivo - n(%)          | 0                  | 2 (2,6%)                          | 2 (3,3%)                           | 0,471  |

**ANA Positivo:** Títulos  $\geq 1/80$ ; **Ac-TG Positivo:** concentrações  $\geq 115$  UI/ml; **Ac-TPO Positivo:** concentrações  $\geq 34$  UI/ml; **Ac-aCL, Ac-aPS Positivo:** IgG  $>40$  GPL ; IgM  $>40$  MPL ; IgA  $>40$  APL.

Na **tabela 6** mostramos os achados laboratoriais das pacientes estudadas, dividindo aquelas com endometriose segundo o local comprometido pela doença. As células NK mostram-se elevadas nas pacientes com doença profunda com  $17,3 \pm 10,5\%$  em relação ao grupo controle com  $10,6 \pm 5,8\%$ , e ao grupo de pacientes com endometriose sem comprometimento profundo com  $11,7 \pm 7,3\%$ ,  $p=0,001$ . Não houve diferenças quanto ao percentual de células NK entre as pacientes com endometriose sem comprometimento profundo e aquelas do grupo controle. Não houve diferenças quanto aos auto-anticorpos, exceto o ANA que manteve-se com

maior prevalência nas portadoras de endometriose em relação ao controle, sem no entanto haver diferenças entre o grupo de pacientes com endometriose com ou sem focos profundos.

**Tabela 6** - Achados Laboratoriais das pacientes estudadas, divididas conforme o local comprometido pela endometriose

|                                     | Controle<br>(n=55) | Endometriose              |                           | p      |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------|
|                                     |                    | SEM Doença Profunda(n=34) | COM Doença Profunda(n=66) |        |
| % de Células NK - (média ± DP)      | 10,6±5,8           | 11,7±7,3                  | 17,3±10,5                 | <0,001 |
| ANA Positivo - n(%)                 | 12,7% (7)          | 38,2% (13)                | 30,0% (20)                | 0,015  |
| Ac-TG Positivo - n(%)               | 10,9% (6)          | 17,6%(6)                  | 13,64% (9)                | 0,665  |
| Ac-TPO Positivo - n(%)              | 20,0% (11)         | 20,6% (7)                 | 16,7% (11)                | 0,852  |
| Ac-TPO e / ou Ac-TG Positivo - n(%) | 23,6% (13)         | 26,5% (9)                 | 22,7% (15)                | 0,916  |
| Ac-aCL IgG Positivo - n(%)          | 1,8%(1)            | 0%(0)                     | 4,5%(3)                   | 0,545  |
| Ac-aCL IgM Positivo - n(%)          | 0                  | 0                         | 0                         |        |
| Ac-aCL IgA Positivo - n(%)          | 1,8% (1)           | 0% (0)                    | 7,6% (5)                  | 0,152  |
| Ac-aPS IgG Positivo - n(%)          | 0% (0)             | 0% (0)                    | 1,5% (1)                  | 1,000  |
| Ac-aPS IgM Positivo - n(%)          | 0                  | 0                         | 0                         |        |
| Ac-aPS IgA Positivo - n(%)          | 0% (0)             | 2,9% (1)                  | 3,0%(2)                   | 0,442  |

**ANA Positivo:** Títulos  $\geq 1/80$ ; **Ac-TG Positivo:** concentrações  $\geq 115$  UI/ml; **Ac-TPO Positivo:** concentrações  $\geq 34$  UI/ml; **Ac-aCL, Ac-aPS Positivo:** IgG >40 GPL ; IgM >40 MPL ; IgA >40 APL

A avaliação mais detalhada de nossos dados mostrou que as pacientes com endometriose com comprometimento de retossigmóide são as principais responsáveis pelo aumento do percentual das células NK no sangue periférico. Como podemos observar na **tabela 7**, nas pacientes com comprometimento de retossigmóide, o percentual de NK encontrado foi de  $19,8 \pm 10,3\%$ , enquanto naquelas com endometriose sem comprometimento

de retossigmóide e as do grupo controle os percentuais de NK foram de  $12,4 \pm 8,3\%$  e  $10,6 \pm 5,8\%$ , respectivamente,  $p < 0,001$ . Não houve diferenças entre o subgrupo com endometriose sem comprometimento de retossigmóide e o grupo controle. Essa subdivisão também evidenciou que a prevalência dos ANA não relacionou-se com algum local específico de doença, como o retossigmóide, pois encontramos nessa comparação prevalência de ANA semelhantes nos dois grupos com endometriose e em ambos significativamente maiores que no grupo controle.

**Tabela 7** - Achados Laboratoriais das pacientes estudadas, divididas conforme o local comprometido pela endometriose, destacando-se as pacientes com comprometimento de retossigmóide

|                                     | Controle<br>(n=55) | Com Endometriose                            |   | p      |
|-------------------------------------|--------------------|---|---|--------|
|                                     |                    | Sem endometriose de retossigmóide<br>(n=59) | Com Endometriose de retossigmóide<br>(n=41) |        |
| % de Células NK - (média $\pm$ DP)  | 10,6 $\pm$ 5,8     | 12,4 $\pm$ 8,3                              | 19,8 $\pm$ 10,3                             | <0,001 |
| ANA Positivo - n(%)                 | 7 (12,7%)          | 18 (30,5%)                                  | 15 (36,6%)                                  | 0,016  |
| Ac-TG Positivo - n(%)               | 6 (10,9%)          | 10 (16,9%)                                  | 5 (12,2%)                                   | 0,943  |
| Ac-TPO Positivo - n(%)              | 11 (20,0%)         | 11 (18,6%)                                  | 7 (17,1%)                                   | 0,966  |
| Ac-TPO e / ou Ac-TG Positivo - n(%) | 13 (23,6%)         | 16 (27,1%)                                  | 8 (19,5%)                                   | 0,680  |
| Ac-aCL IgG Positivo - n(%)          | 1 (1,8%)           | 1 (1,7%)                                    | 2 (4,9%)                                    | 0,678  |
| Ac-aCL IgM Positivo - n(%)          | 0                  | 0   | 0   |        |
| Ac-aCL IgA Positivo - n(%)          | 1 (1,8%)           | 1 (1,7%)                                    | 4 (9,8%)                                    | 0,126  |
| Ac-aPS IgG Positivo - n(%)          | 0                  | 0   | 1 (2,4%)                                    | 0,265  |
| Ac-aPS IgM Positivo - n(%)          | 0                  | 0   | 0   |        |
| Ac-aPS IgA Positivo - n(%)          | 0                  | 1 (1,7%)                                    | 2 (4,9%)                                    | 0,268  |

**ANA Positivo:** Títulos  $\geq$  1/80; **Ac-TG Positivo:** concentrações  $\geq$  115 UI/ml; **Ac-TPO Positivo:** concentrações  $\geq$  34 UI/ml; **Ac-aCL, Ac-aPS Positivo:** IgG >40 GPL ; IgM >40 MPL ; IgA >40 APL

Na **tabela 8** observamos que existem relações entre as concentrações de células NK e a classificação histológica da endometriose, fato que não ocorreu com os auto-anticorpos estudados. As portadoras de endometriose com tipo histológico indiferenciado ou misto apresentaram percentual de células NK de  $17,5 \pm 10,2\%$ , enquanto as com endometriose, mas com tipo histológico sem indiferenciação quer seja na forma pura, quer na forma mista apresentaram um percentual de células NK de  $10,1 \pm 6,4\%$ ,  $p=0,001$ .

**Tabela 8** - Achados Laboratoriais das pacientes com endometriose, divididas conforme a classificação histológica da endometriose

|                                     | Sem indiferenciação<br>n=28 | Com indiferenciação<br>n=72 | p      |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|
| % de Células NK - (média $\pm$ DP)  | 10,1 $\pm$ 6,4              | 17,5 $\pm$ 10,2             | <0,001 |
| ANA Positivo - n(%)                 | 9 (32,1%)                   | 24 (33,3%)                  | 0,909  |
| Ac-TG Positivo - n(%)               | 6 (21,4%)                   | 9 (12,5%)                   | 0,349  |
| Ac-TPO Positivo - n(%)              | 7 (25%)                     | 11 (15,3%)                  | 0,256  |
| Ac-TPO e / ou Ac-TG Positivo - n(%) | 9 (32,1%)                   | 15 (20,8%)                  | 0,234  |
| Ac-aCL IgG Positivo - n(%)          | 0                           | 4,2%(3)                     | 0,369  |
| Ac-aCL IgM Positivo - n(%)          | 0                           | 0                           |        |
| Ac-aCL IgA Positivo - n(%)          | 1 (3,6%)                    | 4 (5,6%)                    | 1,000  |
| Ac-aPS IgG Positivo - n(%)          | 1 (3,6%)                    | 0                           | 0,280  |
| Ac-aPS IgM Positivo - n(%)          | 0                           | 0                           |        |
| Ac-aPS IgA Positivo - n(%)          | 2 (7,1%)                    | 1 (1,4%)                    | 0,189  |

**ANA Positivo:** Títulos  $\geq$  1/80; **Ac-TG Positivo:** concentrações  $\geq$  115 UI/ml; **Ac-TPO Positivo:** concentrações  $\geq$  34UI/ml;  
**Ac-aCL, Ac-aPS Positivo:** IgG >40 GPL ; IgM >40 MPL ; IgA >40 APL

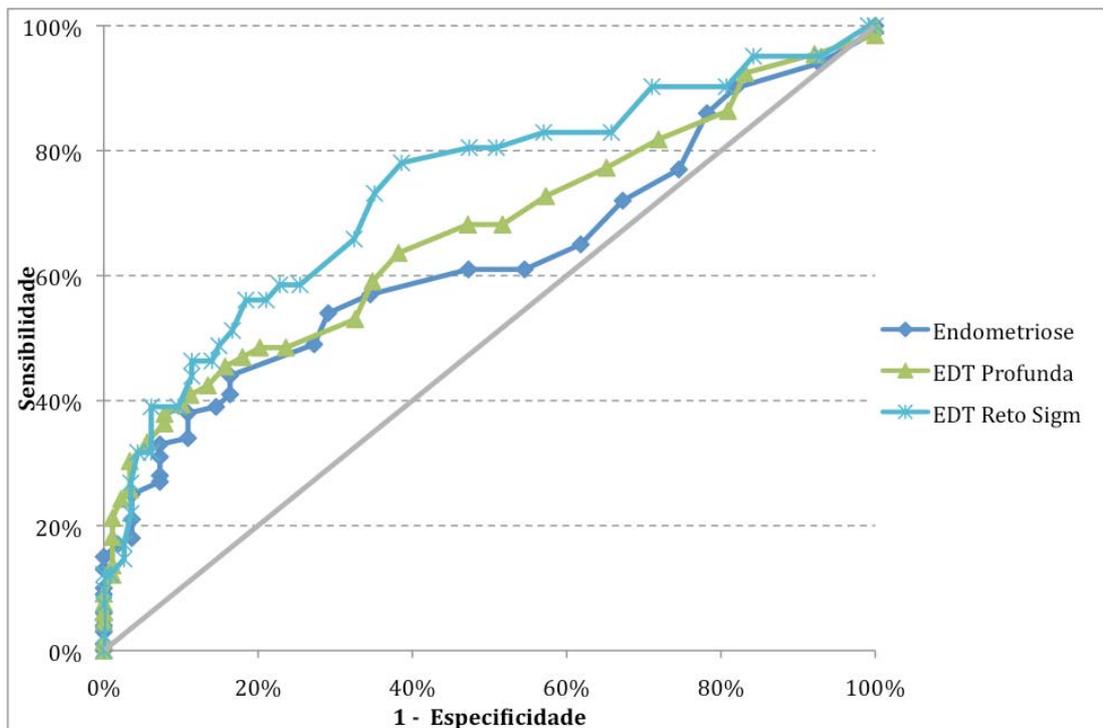
Com o achado de percentual de células NK elevado no sangue periférico de pacientes com endometriose em relação ao grupo controle principalmente graças às pacientes com endometriose profunda, especificamente naquelas com comprometimento de retossigmóide, assim como a maior prevalência de ANA nas portadoras de endometriose tentamos estabelecer um modelo para a utilização desses marcadores como ferramenta no diagnóstico de endometriose.

Quanto ao ANA, esse auto-anticorpo não se mostrou como ferramenta útil na predição da endometriose. Sua positividade com títulos de 1/80 ou mais mostrou sensibilidade de 33%, especificidade de 87%, valor preditivo positivo de 82% e valor preditivo negativo de 41%. Sua utilização também não mostrou resultados de aplicabilidade clínica para a predição de endometriose profunda ou de retossigmóide.

Quanto às células NK, por se tratar de uma variável não paramétrica, buscou-se através de curvas ROC estabelecer o ponto de corte do percentual de células NK que encerrasse melhor sensibilidade e especificidade na predição de diagnóstico de endometriose, endometriose profunda e endometriose de retossigmóide. Curvas ROC referentes ao percentual de NK não apresentaram áreas sobre a curva com boa capacidade preditiva para pacientes com endometriose (0,628; IC de 95% 0,541-0,715) ou para aquelas com endometriose profunda sem especificação do local comprometido pela doença (0,669; IC de 95% 0,580-0,748). Já naquelas com endometriose de retossigmóide encontramos área sob a curva de 0,735 com 95% do IC entre 0,640-0,831. Ou seja, uma área

maior que 0,7 como podemos observar no **gráfico 1**, indicando boa capacidade preditiva do percentual de células NK para esse desfecho (Cantor e Kattan, 2000). Procurando-se associar a maior sensibilidade possível, sem baixa de especificidade, chegou-se ao ponto de corte de 12,5 % de células NK (**Tabela 9**).

**Gráfico 1** - Curva ROC, analisando sensibilidade e especificidade do percentual de células NK para predição de endometriose, endometriose profunda ou endometriose com comprometimento de retossigmoide



**Tabela 9** - Sensibilidade e especificidade, valores preditivos positivo, negativo e acurácia do percentual das células NK na predição de endometriose de retossigmóide

| Teste Positivo   | Sensibilidade<br>( 95% IC ) | Especificidade<br>( 95% IC ) | VPP<br>( 95% IC )       | VPN<br>(95% IC)         | Acurácia<br>(95% IC)   |
|------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>NK ≥11,5%</b> | 78,0%<br>(62,0%- 88,9%)     | 61,4%<br>(51,8%- 70,2%)      | 42,1%<br>(31,0%- 54,0%) | 88,6%<br>(79,0%- 94,3%) | 65,8%<br>(57,8%-73,2%) |
| <b>NK ≥12,5%</b> | 73,2%<br>(56,8%- 85,2%)     | 64,9%<br>(55,3%- 73,5%)      | 42,9%<br>(31,3%- 55,2%) | 87,1%<br>(77,6%- 93,1%) | 67,1%<br>(59,1%-74,4%) |
| <b>NK ≥13,5%</b> | 65,9%<br>(49,3%- 79,4%)     | 67,5%<br>(58,0%- 75,8%)      | 42,2%<br>(30,2%- 55,2%) | 84,6%<br>(75,2%- 91,0%) | 67,1%<br>(59,1%-74,4%) |

A avaliação global de nossos dados mostrou algumas variáveis significativamente relacionadas à endometriose. Do ponto de vista clínico vale citar dismenorréia, dispareunia de profundidade, infertilidade e sintomas intestinais cíclicos. Laboratorialmente os itens estudados não se mostraram como bons marcadores diagnósticos de endometriose. No entanto as células NK mostraram-se efetivas para detectar pacientes com endometriose de retossigmóide. Com essas informações realizamos uma regressão logística utilizando essas variáveis tendo como objetivo a detecção do desfecho endometriose de retossigmóide.

Assim, **na tabela 10** percebemos que na avaliação em conjunto das quatro variáveis clínicas associadas à variável NK com valor  $\geq 12,5\%$  percebemos que variáveis como dismenorréia severa/incapacitante, dispareunia de profundidade, e infertilidade perdem a significância estatística para predição de endometriose de retossigmóide. Por outro lado, sintomas

intestinais cíclicos e concentração de células NK em sangue periférico mantiveram-se como variáveis capazes de prever endometriose de retossigmóide. Assim, pacientes com sintomas intestinais cíclicos têm 7,3 vezes mais chance de apresentar endometriose e aquelas com dosagem de células NK maior ou igual a 12,5% apresentam chance 4,7 vezes maior de terem esses desfecho.

**Tabela 10** - Regressão logística para o diagnóstico endometriose de retossigmóide

|  | <i>Razão de chances de Endometriose Retossigmóide</i> | <i>IC de 95%</i> |
|--|---|------------------|
| <b>Dismenorréia severa / incapacitante</b> | 2,114   | 0,523 -8,554     |
| <b>Dispareunia de Profundidade</b>         | 1,910   | 0,527 - 6,929    |
| <b>Sintomas intestinais cíclicos</b>       | 7,338   | 2,189 - 24,593   |
| <b>Infertilidade</b>                       | 2,638   | 0,831 – 8,376    |
| <b>NK ≥12,5%</b>                           | 4,692   | 1,487 - 14,807   |

Os dados dessa regressão logística, permitem a aplicação de um modelo de probabilidades em nossa população estudada, conforme mostrado a seguir, com o objetivo de diagnosticar endometriose de retossigmóide.

$$P(Y) = \frac{1}{1 + e^{-(\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n)}}$$

Onde:

- P(Y): probabilidade de endometriose de retossigmóide ;
- e: exponencial
- $\alpha$  e  $\beta_1$ : coeficientes de regressão (variáveis estimados pelo modelo de regressão logística)
- $x_1$ : sintoma intestinal cíclico
- $x_2$ : NK  $\geq$  12,5%

Na **tabela 11** observamos que a probabilidade de uma paciente ter endometriose de retossigmóide no caso dela apresentar-se com sintoma intestinal cíclico e com percentual de  $NK \geq 12,5$  é de 60,4%. Por outro lado, se ela tiver apenas sintomas intestinais cíclicos, essa probabilidade será 41,3%; se a paciente apresentar apenas  $NK \geq 12,5$  a probabilidade seria de 36,5%.

**Tabela 11** - Resultados em modelo de probabilidades para endometriose de retossigmóide

| Probabilidade de ter endometriose de retossigmóide | $\alpha$ | $\beta_1$ | Sintoma intestinal cíclico | $\beta_2$ | $NK > 12,5\%$ |
|--|----------|-----------|----------------------------|-----------|---------------|
| <b>60,4%</b>                                       | -1,349   | 0,997     | sim                        | 0,773     | sim           |
| <b>41,3%</b>                                       | -1,349   | 0,997     | sim                        | 0,773     | não           |
| <b>36,0%</b>                                       | -1,349   | 0,997     | não                        | 0,773     | sim           |
| <b>20,6%</b>                                       | -1,349   | 0,997     | não                        | 0,773     | não           |

## 5 DISCUSSÃO

---

Muitos aspectos desafiadores fazem da endometriose uma das afecções ginecológicas mais pesquisadas nos últimos anos. As sociedades européias e americana de medicina reprodutiva (ESHRE e ASRM) publicaram “*guidelines*” objetivando normatização do diagnóstico e tratamento da doença (Kennedy *et al.*, 2005; ASRM, 2008). Paralelamente, aspectos etiopatogênicos vêm sendo estudados e nesse sentido a imunologia é uma das principais linhas de pesquisa. A associação da endometriose com infertilidade permanece desafiadora, e a participação do sistema imune neste binômio foi um dos motivos do início das pesquisas relacionando o sistema imune à endometriose (Weed e Arquembourg, 1980).

As pesquisas mostram que a endometriose é uma doença que deve originar-se com por meio de implante ou metaplasia e que aspectos genéticos e de meio ambiente imbricam-se à permissão imunológica para o seu desenvolvimento (Giudice e Kao, 2004). Fenômenos como diminuição da efetividade da resposta celular das células NK contra antígenos endometriais (Oosterlynck *et al.*, 1992), associados a um alterações na secreção de citocinas gerando resposta inflamatória (Noble *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 2001) e maior produção de certos auto-anticorpos (Shanti *et al.*,

1999) nos fizeram procurar estudar de uma maneira global os fenômenos sistêmicos específicos (com dosagem das células NK e a pesquisa de auto-anticorpos) dessa intrigante doença.

Visando analisar didaticamente os parâmetros estudados, dividiremos esta discussão em avaliação dos aspectos clínicos dos grupos estudados, da prevalência de auto-anticorpos e níveis de células NK nas pacientes estudadas e finalmente discutiremos a utilização das células NK como marcador diagnóstico de endometriose em retossigmóide.

## **5.1 Aspectos Clínicos dos grupos estudados e a dinâmica do estudo**

Inicialmente, avaliando o quadro clínico, vale citar a maior prevalência de sintomas como dismenorréia severa ou incapacitante (66%), dispareunia de profundidade (58%), infertilidade (63%) e sintomas intestinais cíclicos (48%) nas portadoras de endometriose. Em série de 535 pacientes com endometriose e 200 sem a doença publicados pela Universidade de Yale, nos Estados Unidos, sintomas de dismenorréia e dispareunia e dor acíclica também foram mais freqüentes no grupo com endometriose, sendo relatados em 70% e 49% e 79% das pacientes. Esse mesmo estudo demonstrou que as portadoras da doença têm menor número de gestações do que o grupo controle, resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo (Matalliotakis *et al.*, 2008).

Nossos grupos foram divididos em casos ou controles graças à laparoscopia, que permitiu a visualização de focos de endometriose em pacientes sintomáticas (com dor e/ou infertilidade). Esse método nos permitiu isolar a endometriose como variável que poderia ou não se relacionar aos achados laboratoriais pesquisados. Quando se escolhe esse tipo de grupo controle, fica a discussão de outros grupos controles possíveis que teriam benefícios em relação ao por nós estudado.

Poderíamos, por exemplo, escolher um grupo de pacientes sem sintomas sugestivos da doença, que não precisariam ser submetidas a videolaparoscopia, onde estimaríamos em 5-10% a prevalência de endometriose (Giudice e Kao, 2004) e utilizaríamos esse dado na realização dos cálculos estatísticos. O nítido benefício desse grupo seria o de se obter um número maior de pacientes, o que reforçaria o poder dos achados da pesquisa. Por outro lado, esse grupo teria aspectos negativos: não poderíamos presumir os eventuais locais comprometidos por endometriose (peritônio, ovário e profunda) nos 5% da população do “grupo controle”, o que inviabilizaria ou no mínimo causaria discussões sobre achados como os níveis de células NK na população com endometriose profunda de retossigmóide.

Outro tipo de grupo controle seria o de pacientes multíparas que seriam submetidas a laqueadura tubária. Esse grupo seria interessante pelo fato de também haver a documentação laparoscópica da ausência de endometriose, no entanto, esse grupo sofre com a ausência de sintomas, fato que não encontramos em nossa prática clínica diária, o que minimizaria

os achados encontrados quando pensamos em usar os elementos avaliados como marcadores de doença. Assim, optamos pelo grupo controle de pacientes sintomáticas, o que em nossa opinião pode homogeneizar os grupos estudados, utilizando-se como única diferença a presença ou não da endometriose.

Uma característica marcante de nosso estudo foi a alta prevalência das formas mais graves da endometriose. Como pode ser observado na tabela 2, encontramos uma prevalência de estádios avançados de 61%, além de 66% das pacientes apresentarem formas profundas da doença. Isso obviamente deve-se ao fato do estudo ter sido realizado em um serviço de referência para tratamento dessa afecção. Se por um lado isto aumentou a prevalência de formas mais graves, por outro facilitou a avaliação dessa forma da doença, possibilitando termos encontrado exatamente nas pacientes com endometriose avançada, com focos profundos os interessantes achados de maior percentual de células NK no sangue periférico. Todos os outros estudos sobre o tema foram realizados com casuísticas menores ou em populações menos selecionadas, o que pode ter contribuído para o ineditismo de nossos achados. Quanto à classificação histológica, 72% apresentavam focos com formas indiferenciadas ou mistas da doença, dados semelhantes aos publicados por nosso grupo no ano de 2003, onde as formas mais graves associavam-se a tipos histológicos misto ou indiferenciado (Abrao *et al.*, 2003).

## **5.2 Prevalência de auto-anticorpos e níveis de células NK nas pacientes estudadas**

O presente estudo fundamenta-se no fato de existir um papel do sistema imune para o desenvolvimento da endometriose (Ulukus e Arici, 2005) e em nosso questionamento se essa eventual alteração imunológica poderia ser detectada no sangue periférico. Assim procuramos dosar o percentual das células NK e de alguns auto-anticorpos, pois esses parâmetros são freqüentemente relacionados à endometriose e infertilidade, além de serem exames disponíveis na prática clínica de muitos laboratórios. Nesse sentido a comparação dos achados laboratoriais nos trouxe algumas informações relevantes. Em decorrência dos resultados conflitantes obtidos na literatura, além da dificuldade em obter dados homogêneos quanto a métodos laboratoriais optamos por realizar um estudo exploratório, incluindo todas as pacientes submetidas consecutivamente a laparoscopia em nosso serviço. Calculamos então, após os dados obtidos, o poder estatístico da amostra estudada. O poder estatístico da amostra estudada, utilizando-se um índice *alfa* de 5%, para a comparação entre as pacientes com e sem endometriose foi de 96,3% para as células NK e de 78,5% para avaliação dos ANA. Já para os outros auto-anticorpos o poder estatístico variou entre 5-37%.

### 5.2.1 Endometriose e Auto-Anticorpos

Alguns estudos sugerem que a relação de linfócitos T *helper* / linfócitos T *supressor* no sangue e líquido peritoneal esteja aumentada nas portadoras de endometriose, com maior número relativo de linfócitos T *helper* (Hill *et al.*, 1988); essa relação alterada estaria associada a exacerbações na resposta imune humoral, o que explicaria a maior produção de auto-anticorpos nas portadoras de endometriose (Cunningham *et al.*, 1992). Nesse sentido, e baseados na maior prevalência descrita para alguns auto-anticorpos, pesquisamos os auto-anticorpos ANA, Anti-TG, Anti-TPO, Anti-cardiolipinas e antifosfatidilserinas, que são auto-anticorpos que já foram estudados e previamente mostraram-se relacionados a endometriose e/ou infertilidade.

Gleicher *et al.*, (1987) encontraram uma maior prevalência de auto-anticorpos em pacientes com endometriose, sugerindo uma ativação policlonal de linfócitos B. Esses autores chegaram a essa conclusão estudando inicialmente 59 pacientes portadoras de endometriose, comparando os níveis de anticorpos antinucleares (ANA) com 50 mulheres férteis, sem sintomas de endometriose. Encontraram positividade para ANA (títulos acima de 1/80) em 20.3% das pacientes com endometriose. Esse estudo avaliou ainda diversos outros potenciais auto-anticorpos em 31 portadoras de endometriose. Compararam os resultados com as 50 mulheres assintomáticas descritas acima e consideraram como positivo, apenas as amostras nas quais os títulos ou concentrações dos auto-

anticorpos estivessem acima de 2 desvios-padrão dos títulos e concentrações médios encontrados no grupo controle. Dos diversos auto-anticorpos estudados, os autores salientaram reatividade para IgG antifosfatidilserina em 41.9% das portadoras de endometriose, além de outros anticorpos contra diversos fosfolípides (entre eles anticardiolipina, com 25.8%; fosfatidilinositol com 19.4%) foram mais prevalentes nas portadoras de endometriose (Gleicher *et al.*, 1987).

Comparando com esses resultados, nossa população de pacientes com endometriose também apresentou maior prevalência de ANA (33%) em relação ao grupo controle (12,7%), no entanto, nossos resultados demonstraram que a prevalência de anticorpos antifosfatidilserina e anticardiolipina foi semelhante nos grupos estudados. É importante ressaltar que Gleicher *et al* (1987) utilizaram como critério para positividade dos anticorpos aCL e aPS concentrações superiores a dois desvios-padrão da média da população do grupo controle. Além disso, o grupo controle de Gleicher *et al* (1987), foi constituído por pacientes assintomáticas sem a confirmação laparoscópica da ausência da endometriose, o que pode ser um viés na comparação com nossos dados.

Assim como nossos resultados, outros estudos também relataram maior prevalência de ANA nas pacientes com endometriose, como em nosso meio, quando (Pasoto *et al.*, 2005) estudaram 45 portadoras de endometriose, comparando a prevalência de ANA com 21 pacientes de um grupo controle de pacientes férteis submetidas a laqueadura tubária e 15

pacientes lúpicas. Esse estudo encontrou positividade para ANA em 18% da população com endometriose, 0 no grupo controle e em 93% das lúpicas.

Em 1991, Taylor e colaboradores estudaram a prevalência de ANA, anticorpos anticardiolipina (aCL) das classes IgG e IgM, além de anticoagulante lúpico e níveis de imunoglobulinas e complemento no sangue periférico de 71 pacientes com endometriose diagnosticadas por vídeo-laparoscopia, usando como grupo controle as amostras de banco de sangue de uma série de 109 mulheres não grávidas de 20 a 40 anos, independente de sintomas, fertilidade ou co-morbidades. Esses autores relataram prevalências significativamente superiores de positividade para ANA, aCL (IgG ou IgM) e anticoagulante lúpico nas mulheres com endometriose (27,8% , 9,9% e 4,3%) em relação ao grupo controle ( 4,6%, 0 e 0). Ao se avaliar o *pool* de auto-anticorpos estudados, 58% das pacientes com endometriose ( 41 / 71) e 12% do grupo controle (13/109) apresentaram algum auto-anticorpo positivo, diferença estatisticamente significativa. Vale ainda ressaltar que esses autores relataram que a prevalência de ANA foi diretamente proporcional ao estadiamento e que, ao contrario, a prevalência de aCL foi inversamente proporcional ao estadiamento da endometriose (Taylor *et al.*, 1991).

Novamente comparando com nossos resultados, ressaltamos que as pacientes com endometriose apresentaram prevalência de ANA significativamente superior ao grupo controle (12,7%), mesmo quando o grupo de portadoras de endometriose foi subdividido em estádios iniciais (32,8%) e avançados (33,3%), o que também foi relatado no estudo de

Pasoto *et al.*, 2005. Nossos dados também mostraram não haver diferenças quanto a prevalência de quaisquer outros auto-anticorpos estudados na dependência dos locais de doença, fato que não foi estudado por outros autores na literatura.

Ainda em nosso meio (Abrao *et al.*, 1997) estudaram 35 portadoras de endometriose e 15 de um grupo controle de pacientes submetidas a laqueadura tubária. Esses autores relataram que houve aumento nos níveis de aCL IgM em relação a aos níveis do grupo controle, e maior prevalência de positividade para esse auto-anticorpo, utilizando o nível de corte 10 MPL. Nossos resultados diferem dos publicados nesse estudo, mesmo quando usamos um nível de corte semelhante aos relatados por Abrao, pois encontramos prevalências semelhantes de aCL e aPS dos tipos IgG, M e A nos dois grupos estudados.

Avaliando-se criticamente a dosagem de ANAs, estudos mostram que esses anticorpos podem estar presentes na população geral livre de doenças como o lúpus e a prevalência da positividade para esse anticorpo depende do titulação. Considerando-se títulos de até 1/40, até 30% da população normal apresenta ANA +, ao passo que valores de 1/80 ou mais estão presentes em até 13% da população normal (semelhante ao encontrado em nosso grupo controle), sendo por isso os valores considerados com importância clínica (Adams e Mutasim, 2000).

Anticorpos aCL e aPS são anticorpos antifosfolípides que são auto-anticorpos associados a fenômenos tromboembólicos e abortamentos de repetição (Ulcova-Gallova *et al.*, 2005). Da mesma maneira que o ANA, nem

todos os portadores desses auto-anticorpos desenvolverão a doença e esses auto-anticorpos podem apresentar-se transitoriamente presentes graças a processos infecciosos ou uso de determinados fármacos como clorpromazina, fenitoína, hidralazina, procainamida, quinidina, estreptomicina, fenotiazinas (Canoso e de Oliveira, 1988). A Síndrome Antifosfolípide, entidade clínica relacionada a anticorpos antifosfolípides caracteriza-se por critérios clínicos bem estabelecidos como trombozes, acidentes vasculares cerebrais, abortamentos de repetição à presença de determinados anticorpos como o anticoagulante lúpico e os anticorpos anticardiolipina do tipo IgG ou IgM (Miyakis *et al.*, 2006); salientamos que nenhuma de nossas pacientes apresentava episódios prévios de trombose, três ou mais abortamentos ou mau passado obstétrico.

Salientamos ainda que além das avaliações demonstradas em nossas tabelas, também avaliamos estatisticamente os aCL e aPS de três outras maneiras: através da comparação de suas médias e DPs, através da categorização em positivo ou negativo segundo o critério de o valor daquela aCL ou aPS estar acima da média mais dois DPs e finalmente utilizando o critério de positividade na dependência do valor estar acima do percentil 99 da população estudada. Nenhuma dessas três avaliações mostrou resultados estatísticos diferentes dos apresentados com o ponto de corte em 40 GPL, MPL ou APL.

Ao compararmos os resultados dos anticorpos antifosfolípides estudados com publicações prévias, notamos que nossos resultados mostram prevalência desses auto-anticorpos semelhantes nos grupos

estudados, enquanto outros estudos demonstram maior prevalência de positividade desses auto-anticorpos nas portadoras de endometriose. (Kennedy *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1991; Abrao *et al.*, 1997). Isso pode ser explicado pelo fato do corte por nós utilizado ser superior a outras publicações. Outra explicação para essa discrepância é o grupo controle utilizado em nosso estudo, que é um grupo de pacientes sintomáticas (dor e/ou infertilidade), o que difere dos controles utilizados nos estudos citados, que foram compostos por amostras de bancos de sangue de pacientes assintomáticas ou de pacientes submetidas a laqueadura tubária.

Um interessante estudo caso-controle foi realizado nos Estados Unidos com o objetivo de determinar a prevalência de determinadas doenças auto-imunes e metabólicas nas pacientes com endometriose. Para isso os autores enviaram um questionário às mulheres da Associação Americana de Endometriose e compararam os resultados com a prevalência dos mesmos agravos na população norte-americana obtidos por pesquisa em bancos de dados como *Pubmed* ou por relatórios do Centro de Controle de Doenças (CDC). As portadoras de endometriose (n=3680) relataram maior prevalência de LES (0,8%), fibromialgia (5,9%), artrite reumatóide (1,8%) do que a população geral que apresenta as prevalências 0,04%, 3,4% e 1,2%, respectivamente (Sinaii *et al.*, 2002).

A prevalência de fenômenos auto-imunes contra a tireóide na população geral é maior nas mulheres que nos homens e varia entre 3-25%; sabemos que aumenta proporcionalmente à idade tendo sido relatada em 18% nas mulheres de 25 a 30 anos de idade e de 24,9% naquelas com 40-

45 anos de idade em uma grande série de pacientes estudadas na Dinamarca (n=3712) (Bulow Pedersen *et al.*, 2006).

No que tange aos anticorpos antitireóide, a nossa população apresentou positividade para anticorpos anti-TPO e anti-TG no grupo com endometriose (15% e 18% respectivamente) semelhantes ao grupo controle (10,9% e 20% respectivamente). Esses achados são semelhantes aos publicados por (Petta *et al.*, 2007), que estudaram em nosso meio 148 pacientes com endometriose confirmada cirurgicamente comparadas a 158 mulheres que freqüentavam o ambulatório de planejamento familiar da Universidade de Campinas, que não foram submetidas a videolaparoscopia mas foram consideradas como não portadoras de endometriose por não apresentarem história prévia ou sintomas sugestivos da doença. Esses autores relataram anticorpos anti-TPO e anti-TG no grupo com endometriose (11,5% e 8,1% respectivamente) semelhantes ao grupo controle (19,6,% e 8.2% respectivamente). Esse estudo também mostrou não haver diferenças na prevalência de fenômenos auto-imunes relacionados ao estadiamento da doença, resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo.

### **5.2.2 Endometriose e as Células NK no sangue periférico**

Utilizamos a citometria de fluxo para a dosagem das células NK no sangue periférico, por tratar-se de um método consagrado e altamente reprodutível. A maioria dos trabalhos previamente publicados utilizou a mesma tecnologia laboratorial, mas outros utilizaram métodos laboratoriais

menos reprodutíveis, como Hill *et al.* (1988), que usaram uma leitura em microscopia óptica, com marcadores fluorescentes para as células NK. Com esse método, estudou 33 pacientes com endometriose e 8 mulheres férteis sem endometriose. Esses autores relataram número maior de células NK no líquido peritoneal e semelhante no sangue periférico de portadoras de endometriose em relação ao grupo controle (Hill *et al.*, 1988).

No ano de 2003 um estudo multicêntrico realizado no Canadá avaliou o número de leucócitos e seus subtipos no sangue periféricos de 175 portadoras de endometriose e 131 controles (pacientes submetidas a laparoscopia para re-anastomose ou laqueadura tubária) no período de 1997 a 2001. Os autores encontraram percentuais semelhantes de leucócitos, assim como de células NK nas pacientes com ( $9,9 \pm 5,3$  %) e sem ( $9,2 \pm 5,7$ %) endometriose (Gagne *et al.*, 2003b), o que diferiu dos resultados obtidos em nosso estudo, pois encontramos concentração significativamente maior de células NK no sangue periférico de portadoras de endometriose ( $19,8 \pm 10,3$ %) em relação ao grupo controle ( $10,6 \pm 5,8$ %). Algumas características importantes do estudo canadense merecem ser citadas, para comparação com os dados obtidos em nossas pacientes:

- os autores não relataram o estadiamento das pacientes operadas por endometriose, não estabelecendo assim eventuais diferenças relacionadas à gravidade da doença. A observação cuidadosa de nossos dados mostra que as células NK aumentam no sangue periférico graças a casos mais avançados de endometriose e não temos essas informações no estudo canadense;

- o marcador da célula NK utilizada foi o CD3-/CD56+, diferentemente do nosso, que identificou a célula NK de maneira mais específica, através dos marcadores de membrana CD3- / CD56+ / CD16+. O CD16+ é um dos marcadores característicos da célula NK, funcionando como um receptor para a fração Fc dos anticorpos IgG, caracterizando assim um tipo de NK com atividade citotóxica ativada por anticorpos. (Moretta *et al.*, 1989; Dosiou e Giudice, 2005; Fettback *et al.*, 2009).

Outros estudos também avaliaram o percentual de células NK no sangue periférico ou no líquido peritoneal e os resultados são conflitantes. Ho *et al.*, (1995) estudando uma população de 14 mulheres com endometriose em estádios III e IV, comparou o número e percentual de células NK (utilizando citômetro de fluxo com anticorpos monoclonais) no sangue periférico e líquido peritoneal, assim como a citotoxicidade das células NK. Esses autores relataram número semelhante de células NK e menor atividade citotóxica no líquido peritoneal das portadoras de endometriose. Em sangue periférico não foram encontradas diferenças no número ou na atividade das células NK (Ho *et al.*, 1995). Número semelhante de células NK nos grupos com e sem endometriose também foram relatados por (Oosterlynck *et al.*, 1991; Provinciali *et al.*, 1995); por outro lado (Kikuchi *et al.*, 1993) relataram menor número de células NK nas portadoras de endometriose em relação ao grupo controle.

Não existem dados na literatura relacionando a concentração de células NK com características específicas das portadoras de endometriose, como os locais comprometidos pela doença ou a classificação histológica da mesma. Nossos dados demonstraram maior percentual de células NK relacionadas aos estádios avançados (III e IV), à endometriose profunda, predominantemente de retossigmóide e ao tipo histológico com indiferenciação do componente epitelial dos focos de endometriose.

Quanto às características histológicas da endometriose, aceita-se que a doença profunda esteja mais relacionada à classificação indiferenciada ou mista da doença (Abrao *et al.*, 2003; Kamergorodsky *et al.*, 2009), o que relaciona-se com o achado porcentagem de células NK aumentadas em pacientes com endometriose intestinal e com tipo histológico indiferenciado.

Quais seriam os motivos dos nossos achados de aumento do percentual de células NK nas portadoras de endometriose em estádios avançados com comprometimento profundo de retossigmóide?

Os achados de mais células NK circulantes nas pacientes com endometriose em relação ao grupo controle associado ao fato exaustivamente demonstrado na literatura de diminuição da atividade das células NK nas pacientes com endometriose (Kanzaki *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992; Vigano *et al.*, 1993; Oosterlynck *et al.*, 1994a; Oosterlynck *et al.*, 1994b; Wilson *et al.*, 1994; Garzetti *et al.*, 1995) nos levam à conclusão de que nas pacientes com endometriose, o aumento periférico das células NK encontrado em nosso trabalho é uma resposta sistêmica do organismo ao

desenvolvimento da doença. Essa hipótese ganha força ao salientarmos alguns aspectos, como:

- I. observarmos que o subgrupo responsável por esse aumento sistêmico é o de pacientes com doença avançada, profunda, predominantemente em localização de retossigmóide; nossos dados demonstraram claramente que nos estádios iniciais ou naquelas em que não há doença profunda, não existe um aumento significativo dos níveis das células NK.
- II. algumas publicações que avaliaram a atividade das células NK demonstraram que a maior queda na atividade dessas células ocorreu em estádios avançados (Wilson *et al.*, 1994; Garzetti *et al.*, 1995). Com menor atividade haveria uma tentativa do organismo de aumentar o número dessas células com objetivos de diminuir o desenvolvimento da endometriose.

E quais seriam os motivos para a diminuição da atividade das células NK nas portadoras de endometriose? Temos alguns dados interessantes na literatura que podem nos ajudar a entender esse fenômeno:

- I. Substâncias solúveis no líquido peritoneal ou no soro: Kanzaki e colaboradores avaliaram em 1992 a ação do soro de pacientes com endometriose sobre a atividade citotóxica de células natural killer. Para isso, adicionaram o soro de pacientes com e sem endometriose a um ensaio de citotoxicidade. Demonstraram uma diminuição da atividade citotóxica significativa frente à exposição

do soro das pacientes portadoras de endometriose, (Kanzaki et al., 1992). Achados semelhantes foram também relatados pelo grupo de Oosterlynck (Oosterlynck et al., 1993). Nos últimos anos, o setor de endometriose do HCFMUSP avaliou diversas citocinas em pacientes com e sem endometriose, tanto no sangue quanto no líquido peritoneal. Vale citar os achados de aumento nas concentrações de IL-12 no líquido peritoneal encontrado nas portadoras de endometriose em estádios avançados (Fairbanks et al., 2009), assim como o aumento das concentrações do interferon-gama (Podgaec et al., 2007) e das IL-2 e IL-6 (Ejzenberg, 2007) nas portadoras de endometriose. Percebemos com esses resultados que a endometriose é uma doença inflamatória, com uma alteração no padrão de secreção das citocinas. Finalmente, vale lembrar o fato das células NK poderem ser estimuladas por citocinas como IL-12 e que uma das principais citocinas secretadas pelas células NK é o Interferon-gama (Abbas, 2008).

II. Papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade: Ao avaliarmos o comportamento das células NK frente a tumores, postula-se que as células tumorais podem tornar-se alvos para essas células ao diminuírem a expressão de moléculas de superfície do CPH, os chamados antígenos leucocitários humanos ou HLA (Benjamini, 2002) e sabemos que as pacientes com endometriose apresentam maior expressão de CPH-I no endométrio tópico e ectópico (Semino *et al.*, 1995; Kitawaki *et al.*,

2002). Em 1995, Semino *et al* demonstraram que a resistência das células endometriais tópicas e ectópicas a ação citotóxica de linfócitos e células NK seria proporcional à expressão HLA-I nas células endometriais. Ao se estimular a expressão de HLA-I nas culturas de células endometriais com interferon gama, esses autores também demonstraram que ocorreu uma resistência ainda maior à ação citotóxica das células efectoras estudadas (o que também demonstra a possível interação de substâncias solúveis do líquido peritoneal ou do sangue periférico). Mais recentemente, estudou-se a expressão de HLA-I por imunohistoquímica no tecido endometrial tópico, relatando expressão significativamente superior de HLA-I nas glândulas e no estroma endometrial tópico de pacientes com endometriose em relação àquelas sem endometriose (Vernet-Tomas Mdel *et al.*, 2006).

III. Receptores Inibitórios das células NK: conforme citado anteriormente, as células NK expressam receptores KIR inibitórios e ativadores. Alguns desses KIRs inibitórios reconhecem antígenos do CPH Classe I, sendo esse o gatilho para a inibição da citotoxicidade das células NK. Maeda *et al* em 2002, ao comparar 40 pacientes sem endometriose com 42 pacientes com endometriose demonstraram uma relação entre a diminuição da atividade citotóxica das células NK e aumento da expressão de determinados KIRs inibitórios (KIR2DL1) na superfície dessas células NK, fato que ocorreu exclusivamente naquelas pacientes

em estádios avançados, já que a expressão dos KIRs mostrou semelhante nas pacientes em estádios iniciais em relação ao grupo controle (Maeda *et al.*, 2002).

### **5.3 Utilização das células NK como marcador diagnóstico de endometriose em retossigmóide**

Vários pesquisadores tentaram desenvolver marcadores sorológicos diagnósticos para endometriose, o que baseia-se em achados de substâncias que podem participar na gênese da doença e conseqüentemente podem estar com suas concentrações alteradas no sangue periférico, líquido peritoneal, sangue menstrual ou mesmo em biópsias endometriais. Essas alterações seriam então utilizadas como marcadores da doença, e obviamente o mais prático seria a utilização de algum marcador sorológico (Evers *et al.*, 1993; Lambrinoudaki *et al.*, 2009; Lermann *et al.*, 2009). O marcador isolado que mais utilizado foi o CA 125 que inicialmente foi utilizado para diagnóstico de tumores ovarianos. Abrao *et al.*, em 1997 publicaram estudo de 50 pacientes, demonstrando que o CA 125 mostrava-se significativamente elevado (níveis superiores a 100 UI/ml) nos casos de endometriose estágio III e IV (Abrao *et al.*, 1997). Outros autores relatam que a sensibilidade do CA125 para o diagnóstico de endometriose é baixa. Um interessante estudo realizado na Itália demonstrou que o CA125 num nível superior a 35 UI/ml apresenta

sensibilidade de 27% e especificidade de 97%. Esses mesmos autores também avaliaram outros marcadores como IL-6 e CA19-9, mas esses marcadores não adicionaram acurácia ao CA 125 no diagnóstico de endometriose (Somigliana *et al.*, 2004).

Atualmente as publicações tendem a utilizar diversos marcadores em conjunto, formando um painel diagnóstico para proporcionar melhor sensibilidade e especificidade diagnóstica. (Gupta *et al.*, 2006; Nalbanski e Kiurkchiev, 2008). Em 2008, um interessante trabalho publicado por Seeber *et al* avaliaram um painel de sete potenciais marcadores: IL-6, TNF-alfa, MIF (fator inibitório da migração de macrófagos), MCP-1 (proteína quimiotática de macrófago) IFN-gama, leptina, e CA-125. Avaliaram todos esses marcadores em 63 pacientes com endometriose e 78 sem endometriose (sintomáticas, e com laparoscopia sem endometriose). A associação de três marcadores ( CA-125, leptina e MCP-1) propiciou maior acurácia diagnóstico de endometriose, com especificidade de 94% (95% IC: 86%, 98%) e com sensibilidade de 49% (95% IC: 36%, 62%) (Seeber *et al.*, 2008).

Nossos resultados demonstram que ANA e células NK também não se prestam ao diagnóstico de endometriose na população geral. Consideramos que podemos adicionar um provável marcador diagnóstico mas que prestar-se-á ao diagnóstico de formas mais graves da doença, como as pacientes com comprometimento de retossigmóide. O uso da dosagem das células NK não se mostrou eficaz para o diagnóstico de endometriose (com área sob a curva ROC de 0,587) , mas a sua utilização numa população de pacientes sintomáticas pode aumentar a suspeita de

endometriose profunda de retossigmóide. Ao utilizarmos o valor de 12,5% de células NK como *cut-off* obtivemos sensibilidade de 78% e especificidade de 61% para o diagnóstico de endometriose de retossigmóide; com essa informação, poderíamos facilitar o direcionamento dessas pacientes para centros terciários, especializados no diagnóstico e tratamento de formas mais graves de endometriose. Salientamos ainda que a dosagem do percentual de células NK é um método não invasivo, altamente reprodutível e que não sofre variações relacionadas à fase do ciclo, como nossos dados e da literatura demonstraram (Yovel *et al.*, 2001; Rai *et al.*, 2005). Quanto à fase do ciclo existem descrições que mostram que ocorre diminuição na atividade (e não do percentual) das células NK periféricas na fase lútea (Souza *et al.*, 2001). Não encontramos estudos na literatura utilizando a dosagem de células NK no sangue periférico com objetivos de diagnóstico de endometriose ou de endometriose profunda de retossigmóide.

Vale citar uma pesquisa realizada por Gagne *et al.* (2003), que avaliou 173 mulheres com endometriose e 195 controles com o objetivo de associar ao CA125 sérico os resultados de um painel de marcadores de leucócitos pesquisados no endométrio tópico (obtidos por biópsia endometrial). Essa associação demonstrou sensibilidade de 61% e especificidade de 95% para o diagnóstico de endometriose. Entre os leucócitos avaliados, as diferenças na concentração de células NK (caracterizadas como CD16+) fizeram parte do modelo preditivo utilizado para o diagnóstico de endometriose (Gagne *et al.*, 2003a).

Outro aspecto inédito de nosso estudo foi a tentativa de estabelecer um modelo estatístico de probabilidades. Ao realizarmos inicialmente uma regressão logística conseguimos isolar variáveis que em pacientes sintomáticas podem relacionar-se à endometriose de retossigmóide: sintomas intestinais cíclicos e dosagem de células NK  $\geq 12,5\%$ . A utilização dessas variáveis em uma população sintomática, demonstrou que pacientes com ambas variáveis positivas teriam aproximadamente 60% de probabilidade de apresentar endometriose de retossigmóide. O comprometimento intestinal da endometriose é estimado em 5-12% das portadoras de endometriose, e o local mais freqüentemente comprometido é o retossigmóide, responsável por 70-93% de todas as lesões intestinais, ou seja, podemos estimar que a prevalência de endometriose de retossigmóide na população geral varia entre 3-11% (Darai *et al.*, 2005). Obviamente nossos dados ainda devem ser validados em populações maiores e não tão selecionadas. Poderemos com a utilização desse modelo proporcionar às pacientes maior agilidade diagnóstica, ou seja, triando aquelas que necessitam passar por exames de imagem mais detalhados e com maior acurácia para o diagnóstico desse tipo de endometriose, como ultrassom transvaginal com preparo intestinal, ressonância magnética de pelve ou ecoendoscopia (Dumontier *et al.*, 2000; Abrao *et al.*, 2007; Chamie *et al.*, 2009; Goncalves *et al.*, 2009) o que possibilitaria um melhor preparo da equipe cirúrgica e portanto menos complicações relacionadas ao tratamento cirúrgico da endometriose.

Nosso estudo foi pioneiro ao avaliar em conjunto as células NK e alguns auto-anticorpos, evidenciando que existem alterações imunes sistêmicas relacionadas à endometriose. A identificação do aumento das células NK periféricas em pacientes com doença avançada é uma informação relevante que abre espaço para novas linhas de pesquisa no sentido de entender as relações existentes entre essas células e os focos de endometriose, além do potencial uso desse tipo celular em modelos de diagnóstico e eventualmente do tratamento da endometriose. Paralelamente a maior prevalência de ANA encontrada em nosso estudo corrobora com dados existentes na literatura e também nos dá uma sinalização no sentido da co-existência de fenômenos de imunidade humoral em pacientes com endometriose, fenômeno esse que precisa ser mais estudado e compreendido.

A continuidade desse estudo passa pela validação de nosso modelo de probabilidades para o diagnóstico de endometriose de retossigmóide através de estudos envolvendo mais pacientes. Além disso pretendemos em laboratórios de pesquisa básica avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos com aumento de células NK. Para isso deveremos avaliar quais as relações entre a diminuição da atividade das células NK, a expressão de KIRs, expressão dos diversos tipos de HLA-I no tecido endometrial tópico e ectópico, padrão de produção de citocinas, com foco principal na doença profunda de retossigmóide.

---

## 6 CONCLUSÕES

---

- 6.1) A concentração de células NK, assim como a prevalência de ANA no sangue periférico encontram-se elevadas nas portadoras de endometriose;
- 6.2) A prevalência em sangue periférico de auto-anticorpos antitiroglobulina, antitiroperoxidase, anticardiolipina ( IgG, IgM, IgA) e antifosfatidilserina (IgG, IgM e IgA) foi semelhante nas pacientes com e sem endometriose;
- 6.3) Pacientes com endometriose em estádios avançados apresentam concentrações superiores de células NK no sangue periférico;
- 6.4) Pacientes com endometriose de retossigmóide apresentam concentrações superiores de células NK no sangue periférico;
- 6.5) Pacientes com endometriose com padrão histológico indiferenciado apresentam maiores concentrações sanguíneas de células NK;
- 6.6) Não existem relações entre as prevalências de auto-anticorpos anti-TG, anti-TPO, aCL ( IgG, IgM, IgA), aPS ( IgG, IgM e IgA) e ANA com o estadiamento, local de doença ou tipo histológico da endometriose.
- 6.7) Concentração de células NK acima de 12,5% em pacientes com sintomas intestinais cíclico relaciona-se a maior probabilidade diagnóstico de endometriose de retossigmóide.

## 7 ANEXOS

### Anexo 01 - Aprovação do Comitê de Ética e pesquisa da FMUSP

**HC** HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
DA FACULDADE DE MEDICINA  
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

### APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.12.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **888/04**, intitulado: "Avaliação de marcadores imunológicos no sangue e fluido peritoneal de pacientes portadoras de endometriose pélvica" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Maurício Simões Abrão**  
Pesquisador(a) Executante: **Dr. João Antonio Dias Junior**

CAPPesq, 08 de Dezembro de 2004.

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP  
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP  
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

## Anexo 2 – Termo de Consentimento

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

### TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO

(Obrigatório Para Pesquisas Científicas em Seres Humanos - Resolução N° 01 de 13.6.1988 - CNS)

#### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N° : ..... SEXO : M F DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO ..... N° ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE : .....

CEP: . ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N° : ..... SEXO : M F DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO ..... N° ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE : .....

CEP: . ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

#### II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .....

**Avaliação de marcadores imunológicos no sangue e fluido peritoneal de pacientes portadoras de endometriose comparando com um grupo de pacientes sem endometriose.**

2. PESQUISADOR: João Antonio Dias Junior

CARGO/FUNÇÃO: **Médico Ginecologista /Obstetra** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 89.292

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: SEM RISCO RISCO MÍNIMO

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano RISCO MÉDIO X RISCO MAIOR

como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : .3 anos

---

### III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL:

- 1. justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar):** Existe grande probabilidade de a senhora ser portadora de uma doença chamada endometriose. Nesta doença, o endométrio, que a parte do útero que se desprende e sangra na menstruação, pode crescer fora do útero, em outros lugares, como os ovários, o tecido que reveste o abdome internamente (chamado de peritônio) e outras localizações como o intestino, bexiga, entre outros órgãos. Esta doença ( a endometriose) pode causar sintomas como aqueles que a senhora tem. A endometriose acomete um grande número de mulheres, podendo também causar dificuldade para engravidar, sendo interessante avaliar se alguns exames de sangue( como os que serão realizados na senhora) poderiam ajudar no diagnóstico da doença, assim como na avaliação da dificuldade de gravidez. Para o tratamento da sua doença, a senhora terá que ser submetida a uma cirurgia. O objetivo deste estudo é avaliar através da coleta de sangue de seu braço e de líquido que existe em seu abdome no início da cirurgia podem ajudar no diagnóstico e tratamento da sua doença que se chama endometriose.
- 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: (explicitar) :** A senhora será ainda submetida a uma videolaparoscopia, que é um tipo de cirurgia na qual são realizados 3 ou 4 pequenos cortes na barriga e os médicos realizam a cirurgia observando o interior da barriga em uma televisão. O tratamento da senhora não será prejudicado caso a senhora não concorde em participar deste estudo, pois a cirurgia já está indicada e será realizada mesmo que a senhora não queira participar do estudo. No momento do início da cirurgia colheremos uma amostra de sangue de uma de suas veias (costumeiramente no braço) e de líquido do abdômen durante esta cirurgia.
- 3. desconfortos e riscos esperados: (explicitar):** os riscos da cirurgia para a senhora serão os mesmos que a senhora teria se não participasse deste estudo, ou seja, durante a cirurgia podem ocorrer complicações, já que a senhora estará anestesiada, mas, conforme comentado, sua doença exige esta

cirurgia. Todo o procedimento da pesquisa será realizado enquanto a senhora estiver anestesiada. Os desconfortos podem ocorrer depois, como: dor no local da cirurgia, fraqueza, vômito (pela anestesia), infecção no corte e hematoma (mancha roxa na pele) ou infecções.

4. **benefícios que poderão ser obtidos: (explicitar):** com esta pesquisa da qual a senhora está participando, tentamos descobrir se com os exames de sangue e do líquido de seu abdômen poderíamos evitar a cirurgia nos casos de endometriose.
5. **procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: (explicitar):** Ao invés de ser realizada cirurgia, existe tratamento com remédios por boca para a endometriose, sendo que muitas pacientes apresentam melhora sem necessidade de operar. Para o tipo de endometriose que a senhora provavelmente apresenta, sabemos que o tratamento só com remédios costuma ser insuficiente para melhorar os sintomas, sendo a cirurgia uma etapa importante do tratamento.

---

#### **IV – ESCLARECIMENTO DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:**

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

**Sim**

**Não**

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

**Sim**

**Não**

3. compromisso sobre a segurança de que não se identificará o indivíduo e que se manterá o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade:

**Sim**

**Não**

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

**Sim**

**Não**

5. compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando:

**Sim**

**Não**

---

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

**João Antonio Dias Junior**

R. São Sebastião, 550

São Paulo – SP

F: 5182-8205 / 9631-6179

**Pronto-Socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP**

R. Enéas de Carvalho Aguiar – 255

Cerqueira César – São Paulo – SP

Fone: 3069-6000

**11. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

.....

.....

.....

.....

#### **IV - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 11, do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II

São Paulo,                      de                      de 20                      .

---

assinatura do paciente ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador que obteve o consentimento  
(carimbo ou nome Legível)

---

NOTA: Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário pelo paciente.

---

## 8 REFERÊNCIAS

---

1. Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008
2. Abrao, MS; Goncalves, MO; Dias, JA, Jr.; Podgaec, S; Chamie, LP; Blasbalg, R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3092-7.
3. Abrao, MS; Neme, RM; Carvalho, FM; Aldrighi, JM; Pinotti, JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003;82(1):31-40.
4. Abrao, MS; Podgaec, S; Filho, BM; Ramos, LO; Pinotti, JA; de Oliveira, RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod*. 1997;12(11):2523-7.
5. Abrao, MS; Podgaec, S; Pinotti, JA; de Oliveira, RM. Tumor markers in endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 1999;66(1):19-22.
6. Adams, BB; Mutasim, DF. The diagnostic value of anti-nuclear antibody testing. *Int J Dermatol*. 2000;39(12):887-91.
7. Arruda, MS; Petta, CA; Abrao, MS; Benetti-Pinto, CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod*. 2003;18(4):756-9.
8. ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-21.
9. ASRM. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S260-9.
10. Barcz, E; Kaminski, P; Marianowski, L. Role of cytokines in pathogenesis of endometriosis. *Med Sci Monit*. 2000;6(5):1042-6.

11. Bedaiwy, MA; Falcone, T; Sharma, RK; Goldberg, JM; Attaran, M; Nelson, DR; Agarwal, A. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod.* 2002;17(2):426-31.
12. Benjamini, EC; Coico, R; Sunshine, G. *Imunologia*. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002
13. Bohler, HC; Gercel-Taylor, C; Lessey, BA; Taylor, DD. Endometriosis markers: immunologic alterations as diagnostic indicators for endometriosis. *Reprod Sci.* 2007;14(6):595-604.
14. Bulow Pedersen, I; Laurberg, P; Knudsen, N; Jorgensen, T; Perrild, H; Ovesen, L; Rasmussen, LB. Lack of association between thyroid autoantibodies and parity in a population study argues against microchimerism as a trigger of thyroid autoimmunity. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(1):39-45.
15. Bulun, SE. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2009;360(3):268-79.
16. Canoso, RT; de Oliveira, RM. Chlorpromazine-induced anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant: absence of thrombosis. *Am J Hematol.* 1988;27(4):272-5.
17. Cantor, SB; Kattan, MW. Determining the area under the ROC curve for a binary diagnostic test. *Med Decis Making.* 2000;20(4):468-70.
18. Chamie, LP; Blasbalg, R; Goncalves, MO; Carvalho, FM; Abrao, MS; de Oliveira, IS. Accuracy of magnetic resonance imaging for diagnosis and preoperative assessment of deeply infiltrating endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;106(3):198-201.
19. Chapron, C; Chopin, N; Borghese, B; Malartic, C; Decuypere, F; Foulot, H. Surgical management of deeply infiltrating endometriosis: an update. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1034):326-37.
20. Cornillie, FJ; Oosterlynck, D; Lauweryns, JM; Koninckx, PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril.* 1990;53(6):978-83.
21. Cunningham, DS; Hansen, KA; Coddington, CC. Changes in T-cell regulation of responses to self antigens in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril.* 1992;58(1):114-9.
22. Darai, E; Thomassin, I; Barranger, E; Detchev, R; Cortez, A; Houry, S; Bazot, M. Feasibility and clinical outcome of laparoscopic colorectal resection for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(2):394-400.

23. Delves, PJ; Roitt, IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000a;343(1):37-49.
24. Delves, PJ; Roitt, IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2000b;343(2):108-17.
25. Dias, JA, Jr.; de Oliveira, RM; Abrao, MS. Antinuclear antibodies and endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006;93(3):262-3.
26. Dmowski, WP; Steele, RW; Baker, GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;141(4):377-83.
27. Dosiou, C; Giudice, LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev.* 2005;26(1):44-62.
28. Dumontier, I; Roseau, G; Vincent, B; Chapron, C; Dousset, B; Chaussade, S; Moreau, JF; Dubuisson, JB; Couturier, D. [Comparison of endoscopic ultrasound and magnetic resonance imaging in severe pelvic endometriosis]. *Gastroenterol Clin Biol.* 2000;24(12):1197-204.
29. Ejzenberg, D. *Avaliação das concentrações da IL1Beta e 6 e da proteína amilóide A, no líquido peritoneal e no soro de pacientes com endometriose pélvica.* (2007). 104 f. MEstrado (Mestrado) - Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
30. Eskenazi, B; Warner, M; Bonsignore, L; Olive, D; Samuels, S; Vercellini, P. Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;76(5):929-35.
31. Evers, JL; Dunselman, GA; Van der Linden, PJ. Markers for endometriosis. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1993;7(4):715-39.
32. Fairbanks, F; Abrao, MS; Podgaec, S; Dias, JA, Jr.; de Oliveira, RM; Rizzo, LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. *Fertil Steril.* 2009;91(2):320-4.
33. Fettback, PBT; Domingues, TS; Hassun Filho, PA; Motta, ELA; Serafini, PC; Baracat, EC. Celulas natural killer endometriais: o que são? o que fazem? o que devemos saber? *Femina.* 2009;37(7):6.
34. Gagne, D; Rivard, M; Page, M; Lepine, M; Platon, C; Shazand, K; Hugo, P; Gosselin, D. Development of a nonsurgical diagnostic tool for endometriosis based on the detection of endometrial leukocyte subsets and serum CA-125 levels. *Fertil Steril.* 2003a;80(4):876-85.

35. Gagne, D; Rivard, M; Page, M; Shazand, K; Hugo, P; Gosselin, D. Blood leukocyte subsets are modulated in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2003b;80(1):43-53.
36. Garzetti, GG; Ciavattini, A; Provinciali, M; Muzzioli, M; Di Stefano, G; Fabris, N. Natural killer activity in stage III and IV endometriosis: impaired cytotoxicity and retained lymphokine responsiveness of natural killer cells. *Gynecol Endocrinol.* 1995;9(2):125-30.
37. Gerhard, I; Becker, T; Eggert-Kruse, W; Klinga, K; Runnebaum, B. Thyroid and ovarian function in infertile women. *Hum Reprod.* 1991;6(3):338-45.
38. Giudice, LC; Kao, LC. Endometriosis. *Lancet.* 2004;364(9447):1789-99.
39. Gleicher, N; el-Roeiy, A; Confino, E; Friberg, J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol.* 1987;70(1):115-22.
40. Goncalves, MO; Dias, JA, Jr.; Podgaec, S; Averbach, M; Abrao, MS. Transvaginal ultrasound for diagnosis of deeply infiltrating endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;104(2):156-60.
41. Grimes, DA; LeBolt, SA; Grimes, KR; Wingo, PA. Systemic lupus erythematosus and reproductive function: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;153(2):179-86.
42. Gupta, S; Agarwal, A; Sekhon, L; Krajcir, N; Cocuzza, M; Falcone, T. Serum and peritoneal abnormalities in endometriosis: potential use as diagnostic markers. *Minerva Ginecol.* 2006;58(6):527-51.
43. Halme, J; Hammond, MG; Hulka, JF; Raj, SG; Talbert, LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984;64(2):151-4.
44. Harada, T; Iwabe, T; Terakawa, N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;76(1):1-10.
45. Hill, JA; Faris, HM; Schiff, I; Anderson, DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1988;50(2):216-22.
46. Hirata, J; Kikuchi, Y; Imaizumi, E; Tode, T; Nagata, I. Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors. *Gynecol Obstet Invest.* 1994;37(1):43-7.
47. Ho, HN; Chao, KH; Chen, HF; Wu, MY; Yang, YS; Lee, TY. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod.* 1995;10(10):2671-5.

48. Iwasaki, K; Makino, T; Maruyama, T; Matsubayashi, H; Nozawa, S; Yokokura, T. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil Menopausal Stud.* 1993;38(4):229-34.
49. Kamergorodsky, G; Ribeiro, PA; Galvao, MA; Abrao, MS; Donadio, N; Lemos, NL; Aoki, T. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril.* 2009;92(6):2074-7.
50. Kanzaki, H; Wang, HS; Kariya, M; Mori, T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167(1):257-61.
51. Kennedy, S; Bergqvist, A; Chapron, C; D'Hooghe, T; Dunselman, G; Greb, R; Hummelshoj, L; Prentice, A; Saridogan, E. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2698-704.
52. Kennedy, SH; Nunn, B; Cederholm-Williams, SA; Barlow, DH. Cardiolipin antibody levels in endometriosis and systemic lupus erythematosus. *Fertil Steril.* 1989;52(6):1061-2.
53. Kikuchi, Y; Ishikawa, N; Hirata, J; Imaizumi, E; Sasa, H; Nagata, I. Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1993;72(3):157-61.
54. Kilpatrick, DC; Haining, RE; Smith, SS. Are cardiolipin antibody levels elevated in endometriosis? *Fertil Steril.* 1991;55(2):436-7.
55. Kim, CH; Chae, HD; Kang, BM; Chang, YS; Mok, JE. The immunotherapy during in vitro fertilization and embryo transfer cycles in infertile patients with endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res.* 1997;23(5):463-70.
56. Kitawaki, J; Obayashi, H; Kado, N; Ishihara, H; Koshiba, H; Maruya, E; Saji, H; Ohta, M; Hasegawa, G; Nakamura, N; Yoshikawa, T; Honjo, H. Association of HLA class I and class II alleles with susceptibility to endometriosis. *Hum Immunol.* 2002;63(11):1033-8.
57. Lambrinouadaki, IV; Augoulea, A; Christodoulakos, GE; Economou, EV; Kaparos, G; Kontoravdis, A; Papadias, C; Creatsas, G. Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2009;91(1):46-50.
58. Lebovic, DI; Mueller, MD; Taylor, RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;75(1):1-10.

59. Lermann, J; Mueller, A; Korber, F; Oppelt, P; Beckmann, MW; Dittrich, R; Renner, SP. Evaluation of high-sensitivity C-reactive protein in comparison with C-reactive protein as biochemical serum markers in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2009.
60. Maeda, N; Izumiya, C; Yamamoto, Y; Oguri, H; Kusume, T; Fukaya, T. Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;77(2):297-302.
61. Matalliotakis, IM; Cakmak, H; Fragouli, YG; Goumenou, AG; Mahutte, NG; Arici, A. Epidemiological characteristics in women with and without endometriosis in the Yale series. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;277(5):389-93.
62. Mathur, S; Chihal, HJ; Himm, RJ; Garza, DE; Rust, PF; Williamson, HO. Endometrial antigens involved in the autoimmunity of endometriosis. *Fertil Steril*. 1988;50(6):860-3.
63. Mathur, S; Peress, MR; Williamson, HO; Youmans, CD; Maney, SA; Garvin, AJ; Rust, PF; Fudenberg, HH. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol*. 1982;50(2):259-66.
64. Meyer, R. Uber den staude der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyonetitis sarcomatosa. . *Zentralbl. Gynakol*. 1919;36):745-59.
65. Miyakis, S; Lockshin, MD; Atsumi, T; Branch, DW; Brey, RL; Cervera, R; Derksen, RH; PG, DEG; Koike, T; Meroni, PL; Reber, G; Shoenfeld, Y; Tincani, A; Vlachoyiannopoulos, PG; Krilis, SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):295-306.
66. Moretta, A; Sivori, S; Vitale, M; Pende, D; Morelli, L; Augugliaro, R; Bottino, C; Moretta, L. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med*. 1995;182(3):875-84.
67. Moretta, A; Tambussi, G; Ciccone, E; Pende, D; Melioli, G; Moretta, L. CD16 surface molecules regulate the cytolytic function of CD3CD16+ human natural killer cells. *Int J Cancer*. 1989;44(4):727-30.
68. Moretta, L; Bottino, C; Pende, D; Mingari, MC; Biassoni, R; Moretta, A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1205-11.

69. Nalbanski, A; Kiurkchiev, D. [The use of biochemical markers in diagnosis of endometriosis]. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2008;47(4):19-22.
70. Noble, LS; Takayama, K; Zeitoun, KM; Putman, JM; Johns, DA; Hinshelwood, MM; Agarwal, VR; Zhao, Y; Carr, BR; Bulun, SE. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(2):600-6.
71. Nothnick, WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril*. 2001;76(2):223-31.
72. Oosterlynck, DJ; Cornillie, FJ; Waer, M; Vandeputte, M; Koninckx, PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*. 1991;56(1):45-51.
73. Oosterlynck, DJ; Meuleman, C; Lacquet, FA; Waer, M; Koninckx, PR. Flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1994a;31(1):25-31.
74. Oosterlynck, DJ; Meuleman, C; Waer, M; Koninckx, PR. CO2-laser excision of endometriosis does not improve the decreased natural killer activity. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1994b;73(4):333-7.
75. Oosterlynck, DJ; Meuleman, C; Waer, M; Koninckx, PR; Vandeputte, M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1993;82(2):206-12.
76. Oosterlynck, DJ; Meuleman, C; Waer, M; Vandeputte, M; Koninckx, PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1992;58(2):290-5.
77. Pasoto, SG; Abrao, MS; Viana, VS; Bueno, C; Leon, EP; Bonfa, E. Endometriosis and systemic lupus erythematosus: a comparative evaluation of clinical manifestations and serological autoimmune phenomena. *Am J Reprod Immunol*. 2005;53(2):85-93.
78. Petta, CA; Arruda, MS; Zantut-Wittmann, DE; Benetti-Pinto, CL. Thyroid autoimmunity and thyroid dysfunction in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(10):2693-7.
79. Podgaec, S; Abrao, MS; Dias, JA, Jr.; Rizzo, LV; de Oliveira, RM; Baracat, EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1373-9.
80. Poppe, K; Glinoeer, D; Van Steirteghem, A; Tournaye, H; Devroey, P; Schiettecatte, J; Velkeniers, B. Thyroid dysfunction and autoimmunity in infertile women. *Thyroid*. 2002;12(11):997-1001.

81. Provinciali, M; Di Stefano, G; Muzzioli, M; Garzetti, GG; Ciavattini, A; Fabris, N. Relationship between 17-beta-estradiol and prolactin in the regulation of natural killer cell activity during progression of endometriosis. *J Endocrinol Invest.* 1995;18(8):645-52.
82. Rai, R; Sacks, G; Trew, G. Natural killer cells and reproductive failure--theory, practice and prejudice. *Hum Reprod.* 2005;20(5):1123-6.
83. Sampson, JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14):422 - 69.
84. Seeber, B; Sammel, MD; Fan, X; Gerton, GL; Shaunik, A; Chittams, J; Barnhart, KT. Panel of markers can accurately predict endometriosis in a subset of patients. *Fertil Steril.* 2008;89(5):1073-81.
85. Semino, C; Semino, A; Pietra, G; Mingari, MC; Barocci, S; Venturini, PL; Ragni, N; Melioli, G. Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril.* 1995;64(5):909-16.
86. Shanti, A; Santanam, N; Morales, AJ; Parthasarathy, S; Murphy, AA. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1999;71(6):1115-8.
87. Simoens, S; Hummelshoj, L; D'Hooghe, T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update.* 2007;13(4):395-404.
88. Sinaii, N; Cleary, SD; Ballweg, ML; Nieman, LK; Stratton, P. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod.* 2002;17(10):2715-24.
89. Somigliana, E; Vignani, P; Tirelli, AS; Felicetta, I; Torresani, E; Vignani, M; Di Blasio, AM. 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.
90. Souza, SS; Castro, FA; Mendonca, HC; Palma, PV; Morais, FR; Ferriani, RA; Voltarelli, JC. Influence of menstrual cycle on NK activity. *J Reprod Immunol.* 2001;50(2):151-9.
91. Tanaka, E; Sendo, F; Kawagoe, S; Hiroi, M. Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 1992;34(1):27-30.

92. Taylor, PV; Maloney, MD; Campbell, JM; Skerrow, SM; Nip, MM; Parmar, R; Tate, G. Autoreactivity in women with endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol.* 1991;98(7):680-4.
93. Ulcova-Gallova, Z; Krauz, V; Novakova, P; Milichovska, L; Micanova, Z; Bibkova, K; Sucha, R; Turek, J; Balvin, M; Rokyta, Z. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol.* 2005;54(2):112-7.
94. Ulukus, M; Arici, A. Immunology of endometriosis. *Minerva Ginecol.* 2005;57(3):237-48.
95. Vernet-Tomas Mdel, M; Perez-Ares, CT; Verdu, N; Molinero, JL; Fernandez-Figueras, MT; Carreras, R. The endometria of patients with endometriosis show higher expression of class I human leukocyte antigen than the endometria of healthy women. *Fertil Steril.* 2006;85(1):78-83.
96. Vigano, P; Vercellini, P; Di Blasio, AM; Colombo, A; Battista Candiani, G; Vignali, M. "Killer cells" and endometriosis. *Fertil Steril.* 1993;60(5):928-9.
97. Weed, JC; Arquembourg, PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol.* 1980;23(3):885-93.
98. Wilson, TJ; Hertzog, PJ; Angus, D; Munnery, L; Wood, EC; Kola, I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril.* 1994;62(5):1086-8.
99. Yeaman, GR; Collins, JE; Lang, GA. Autoantibody responses to carbohydrate epitopes in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;955):174-82; discussion 199-200, 396-406.
100. Yovel, G; Shakhar, K; Ben-Eliyahu, S. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. *Gynecol Oncol.* 2001;81(2):254-62.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)