

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CLÁUDIA MARIA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MARCADORES DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E ANGIOGÊNESE EM SANGUE PERIFÉRICO E  
MENSTRUAL DE MULHERES PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE**

Belo Horizonte

2013

**CLÁUDIA MARIA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MARCADORES DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E ANGIOGÊNESE EM SANGUE PERIFÉRICO E  
MENSTRUAL DE MULHERES PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE**

Dissertação de Mestrado em Saúde da  
Mulher para obtenção do título de Mestre em  
Medicina Universidade Federal de Minas  
Gerais Programa de Pós-graduação em  
Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina

Orientadora: Márcia Mendonça Carneiro

Co-orientadora: Andrezza Vilaça Belo

Belo Horizonte

2013

Silva, Cláudia Maria da.

SI586a            Avaliação da presença de marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em sangue periférico e menstrual de mulheres portadoras de endometriose [manuscrito]. / Cláudia Maria da Silva. - - Belo Horizonte: 2013.

96f.

Orientador (a): Márcia Mendonça Carneiro.

Área de concentração: Saúde da Mulher.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

**CLÁUDIA MARIA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MARCADORES DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E ANGIOGÊNESE EM SANGUE PERIFÉRICO E MENSTRUAL  
DE MULHERES PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE**

Dissertação de Mestrado em Saúde da Mulher para obtenção do título de Mestre em  
Medicina Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em  
Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina

Banca Examinadora

.....  
Profa. Dra. Márcia Mendonça Carneiro - UFMG

.....  
Prof. Dra. Márcia Cristina França Ferreira - UFMG

.....  
Profa. Dra. Sílvia Passos Andrade – UFMG

Conceito:  
.....

Belo Horizonte,.....de.....de.....

### **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Célio e Solange que sempre me apoiaram e incentivaram para os estudos.*

*Aos meus irmãos André e Célia, muito mais do que uma família.*

*Ao meu marido Pedro, que me motivou e apoiou em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que me ajudaram a concluir esta dissertação, em especial à minha orientadora, professora Márcia Mendonça Carneiro, exemplo de profissionalismo e dedicação, com quem pude contar durante todo esse longo caminho percorrido.

Ao professor Agnaldo Lopes Silva-Filho pelo incentivo à criação deste projeto e essencial colaboração.

À professora e amiga Andrezza Vilaça Belo que contribuiu em todos os momentos.

Aos pacientes e voluntários que compreenderam o objetivo do trabalho.

À equipe do ambulatório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais e do Instituto Jenny de Andrade Faria pelo auxílio e receptividade na condução desse projeto de Pesquisa.

À equipe de pesquisa do laboratório de Angiogênese do ICB-UFMG, em especial à professora Sílvia Passos Andrade e Paula Peixoto Campos.

Ao amigo Bruno Muzzi pelo auxílio em momentos importantes da dissertação

E finalmente, agradeço a alguém mais que especial, meu marido Pedro que me auxiliou em vários momentos durante este trabalho.

**Universidade Federal de Minas Gerais**

Reitor:

Professor Dr. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora:

Professora Dra. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação:

Professor Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisas:

Professor Dr. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina:

Professor Dr. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina:

Professor Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação:

Professor Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:

Professora Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Professor Dr. Cezar Alencar de Lima Rezende

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

Professor Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:

Professora Dra. Alamanda Kfoury Pereira

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

Professor Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral

Professora Dra. Alamanda Kfoury Pereira

Professor Dr. Selmo Geber

Professor Dr. Victor Hugo de Melo

Professor Dr. Gabriel Costa Ozanan – Representante Discente

*O impossível está a um passo da  
nossa superação, a partir do  
momento que nos superamos algo  
impossível se realiza.*

*Sérgio Pinheiro*

## RESUMO

A resposta inflamatória e a angiogênese parecem desempenhar um papel importante na endometriose. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença dos marcadores de resposta inflamatória e angiogênese NAG (N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase), MPO (mieloperoxidase), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), em amostras de sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose.

Este foi um estudo transversal envolvendo 17 pacientes que foram divididas em 2 grupos: endometriose (n=10) e controles (n=7). Os critérios de inclusão foram ciclos menstruais regulares, sem uso de agentes anti-inflamatórios ou hormonais por pelo menos 3 meses antecedendo a data da coleta, e confirmação ou exclusão do diagnóstico de endometriose por cirurgia. Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento informado. As amostras de sangue menstrual e periférico foram coletadas na fase folicular do ciclo (entre o 1° e 4° dia da menstruação). A atividade de NAG e MPO foram avaliadas por reações enzimáticas, a dosagem de TNF- $\alpha$  e VEGF por imunoenensaio, usando ELISA (Duoset Kit -R & D Systems). O software utilizado na análise estatística foi o GraphPad Prism 5 e IBM SPSS Statistics21. O nível de significância adotado no trabalho foi de 5%.

Os grupos foram considerados homogêneos para idade, IMC e intervalo do ciclo menstrual. A maioria (90%) das pacientes apresentava dor pélvica crônica, (30%) era infértil e a maioria (50%) foi classificada como estágio II da ASRM (1996). Quando os grupos foram comparados, não houve diferença significativa entre os casos e os controles para as variáveis NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF, tanto para as amostras de sangue menstrual como para as de sangue periférico. Quando comparado amostras de sangue menstrual e periférico, a atividade de NAG e MPO foi significativamente maior nas amostras de sangue menstrual nas pacientes portadoras de endometriose ( $p = 0,039$  e  $p = 0,0117$ ) respectivamente. Houve uma correlação linear positiva (teste Rô de Spearman) nas amostras de sangue sérico para NAG e MPO ( $p = 0,07$  e  $r = 0,641$ ) e também nas amostras de sangue menstrual ( $p = 0,01$  e  $r = 0,603$ ). Não observou-se diferença significativa na resposta inflamatória e de angiogênese para NAG, MPO, TNF-  $\alpha$  e VEGF comparando pacientes sintomáticas e assintomáticas.

Foi possível a detecção de marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em amostras de sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras de endometriose e seus controles. NAG e MPO, marcadores da atividade de leucócitos, foram significativamente maiores em amostras de sangue menstrual das pacientes portadoras de endometriose em relação ao sangue periférico. Identificou-se ainda uma correlação linear positiva entre NAG e MPO nas amostras de sangue sérico e menstrual, o que pode sugerir uma maior atividade inflamatória local nas pacientes portadoras da doença.

**Palavras chaves:** sangue menstrual, endometriose, inflamação, angiogênese

## ABSTRACT

Inflammation and angiogenesis appear to play an important role in the pathogenesis of endometriosis. We aimed at evaluating the presence of inflammation and angiogenesis markers myeloperoxidase (MPO), N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in peripheral and menstrual blood in women with and without endometriosis. This transversal study included 17 women: endometriosis (n=10) and control (n=7). Menstrual and peripheral blood samples were collected between 1st and 4th day of menses. NAG and MPO activity was evaluated by enzymatic methods, whereas TNF- $\alpha$  and VEGF by immunoassay. When groups were compared, no statistical difference was found for NAG, MPO, TNF- $\alpha$  and VEGF nor in the menstrual nor in peripheral blood. Menstrual blood NAG and MPO activities in the endometriosis group were significantly higher in comparison to peripheral blood,  $p = 0.039$  and  $0.0117$  respectively. Both, NAG and MPO presented positive linear correlation in peripheral, ( $p = 0.07$ ;  $r = 0.641$ ) and menstrual blood, ( $p = 0.01$ ;  $r = 0.603$ ). Comparison between symptomatic patients and asymptomatic for NAG, MPO, TNF- $\alpha$  and VEGF revealed no statistical difference. We confirmed the presence of inflammatory and angiogenesis markers in the menstrual blood. NAG and MPO activity were significantly higher in the menstrual blood of endometriosis patients and NAG and MPO presented a positive linear correlation in both, menstrual and serum blood, which could account for increased local inflammatory activity in these women.

**Keywords:** menstrual blood, endometriosis, inflammation, angiogenesis

## LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina Serum Bovina- Calbiochem -126593-100g-Fraction V,
RIA and ELISA)	
C3	Proteína do complemento 3
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPI	Endometriose Profunda Infiltrativa
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FIV	Fertilização “ <i>In Vitru</i> ”
FGF/FGF-β	Fator de crescimento de fibroblastos/Beta
g	gramas
H <sub>2</sub> O	água
HTAB	<i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potássio Diidrogênio Fosfato
IL-1/IL-1B	Interleucina 1/1B
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Quimiocina CXCL8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13

L	litros
ml	mililitros
mg	miligramas
MPO	Mieloperoxidase
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMPs	Matriz - metaloproteinases
MPC-1	Proteína quimioatrativa para monócitos 1
μl	microlitros
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NAG	N-Acetilglicosaminidase
Nm/ml	nanomol por mililitro
NK	Células <i>Natural Killer</i>
PA	Pressão Arterial
PMN	Neutrófilo Polimorfonuclear
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PAF	Fator ativador de plaquetas
Pg/ml	picograma por mililitro
PP14	Glicodelina derivada do endométrio
RNA/m	Ácido Ribonucleico/mensageiro
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RPM	Rotações por minuto
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF/TNF-α	Fator de necrose tumoral/alfa
TNF/RI-RII	Receptor de fator de necrose tumoral I e II
TGFs/ TGF-β	Fatores de crescimento de transformação/Beta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VCAM-1	Molécula de adesão
VLA-4	Integrina VLA-4

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 - Dosagem de NAG.....	48
Esquema 2 - Dosagem de MPO.....	49
Esquema 3 - Kit- Duoset-R&D systems-ELISA.....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico de Boxplot para ciclo menstrual, idade e IMC entre os grupos.....	52
Figura 2 - Gráfico de Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual/ NAG.....	55
Figura 3 - Gráfico de Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual/MPO.....	57
Figura 4 - Gráfico de Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual/ TNF- $\alpha$ .....	58
Figura 5 - Gráfico de Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual/VEGF.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas Descritivas e Teste de Mann-Whitney para ciclo menstrual, idade e IMC nos grupos caso e controle.....	53
Tabela 2 - Descrição esquemática das características clínicas entre casos e controles.....	54
Tabela 3 - Medidas Descritivas e Teste de Mann-Whitney para as variáveis MPO, VEGF, TNF- $\alpha$ , e NAG entre os grupos caso e controle em cada tipo de sangue....	60
Tabela 4- Medidas descritivas e Teste de Wilcoxon para as diferenças entre sangue periférico e menstrual nas variáveis MPO, VEGF, TNF- $\alpha$ e NAG em cada um dos grupos.....	61
Tabela 5 – Medidas descritivas e teste de Mann-Whitney para avaliação do sintoma dor pélvica e marcadores inflamatórios e angiogênicos.....	62
Tabela 6 - Medidas descritivas e teste de Mann-Whitney para avaliação do sintoma infertilidade e marcadores inflamatórios e angiogênicos.....	63
Tabela 7 - Medidas descritivas e teste de Mann-Whitney para avaliação do sintoma dispareunia e marcadores inflamatórios e angiogênicos.....	63

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1 A ENDOMETRIOSE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO</b> .....	22
1.1 MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS.....	25
1.1.1 N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase.....	27
1.1.2 Mieloperoxidase.....	29
1.2 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA.....	30
1.3 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL.....	32
<b>2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A MENSTRUAÇÃO</b> .....	35
<b>3 FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE</b> .....	37
<b>4 OBJETIVO</b> .....	40
4.1 OBJETIVO GERAL.....	40
4.1.1 Objetivos específicos.....	41
<b>5 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	42
5.1 PACIENTES.....	42
5.1.1 Critérios de Inclusão.....	42
5.1.2 Critérios de Exclusão.....	43
5.1.3 Grupos.....	43
5.1.3 Cálculo Amostral.....	44
5.2 MÉTODOS.....	45

<b>5.2.1 Coleta das Amostras</b> .....	46
<b>5.2.2 Dosagens Laboratoriais</b> .....	47
<b>6 RESULTADOS</b> .....	52
6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA.....	52
6.2 ATIVIDADE DE N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE.....	54
6.3 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE.....	56
6.4 DOSAGEM DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA.....	57
6.5 DOSAGEM DE FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL.....	58
6.6 RESUMO DE ANÁLISE DAS VARIÁVEIS MPO, VEGF, TNF- $\alpha$ , NAG.....	60
6.7 RESUMO DA COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E MENSTRUAL NOS CASOS E NOS CONTROLES PARA AS VARIÁVEIS MPO, VEGF, TNF- $\alpha$ e NAG.....	61
6.8 COMPARAÇÃO DOS SINTOMAS DE DOR, DISPAREUNIA E INFERTILIDADE COM AS VARIÁVEIS NAG, MPO, TNF- $\alpha$ E NAG.....	62
6.9 CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	64
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
<b>APÊNDICES</b> .....	89

## INTRODUÇÃO

Endometriose é definida pela presença histopatológica de estroma e/ou tecido glandular endometrial fora da cavidade uterina, que se implanta no peritônio e vísceras da pelve feminina, podendo, entretanto, comprometer outros órgãos (Groothuis, Nap *et al.*, 2005; Baldi, Campioni *et al.*, 2008; Leyendecker, Wildt *et al.*, 2009; Taylor, Yu *et al.*, 2009). Apesar da alta prevalência pouco se conhece sobre sua fisiopatologia, diagnóstico e tratamento (N Tariverdian, 2007).

A endometriose é uma doença benigna estrogênio-dependente que acomete 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (Bulun, 2009; Serdar E. Bulun, 2009; Burney e Giudice, 2012). As pacientes com dor pélvica e/ou infertilidade têm prevalência ainda maior, ocorrendo entre 35 a 60%. (N Tariverdian, 2007; Baldi, Campioni *et al.*, 2008; Bulun, 2009; Serdar E. Bulun, 2009). É a doença benigna mais frequente do trato genital feminino, entretanto pouco se conhece sobre a genética, mecanismo permissivo e de manutenção da doença (Baldi, Campioni *et al.*, 2008; Taylor, Yu *et al.*, 2009). Suas principais características clínicas são dor pélvica crônica, dor durante o intercuro sexual e infertilidade (Bulun, 2009).

Não existe uma teoria única que explique a origem da endometriose, ao contrário várias teorias têm sido propostas. Estas podem ser categorizadas em teorias que defendem a origem endometrial dos implantes endometrióticos pelo refluxo menstrual e outras que estes implantes poderiam derivar de outros tecidos. O que todas elas têm em comum é a consideração de que fatores desencadeantes e a susceptibilidade genética estão relacionados com a doença e estão começando a serem delineados (Burney e Giudice, 2012). As seguintes teorias têm sido propostas:

- a) a teoria do desenvolvimento de remanescentes Mullerianos: como os ovários e ductos Mullerianos derivam do epitélio celômico, sugere-se que o epitélio germinal do ovário pode ser transformado por metaplasia em endométrio, o que explicaria somente a endometriose ovariana (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001);

- b) a teoria da metaplasia celômica: estendendo-se a primeira teoria para a serosa peritoneal, que é conhecida pelo seu potencial para proliferação e diferenciação, explica-se a existência de endometriose na ausência de menstruação, induzidas por fatores ambientais (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Baldi, Campioni *et al.*, 2008; Burney e Giudice, 2012). A teoria da indução está intimamente relacionada com esta, propõe a diferenciação de células peritoneais em endometriais por fatores hormonais ou imunológicos (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Burney e Giudice, 2012);
- c) uma teoria mais recente tem proposto que células tronco/progenitoras de origem extra-uterina, da medula óssea, poderiam diferenciar em tecido endometriótico (Sasson e Taylor, 2008; Bulun, 2009). Nesse sentido, linhagens celulares candidatas incluem células tronco progenitoras da medula óssea e células progenitoras endoteliais. A confirmação histopatológica de tecido endometriótico em pacientes com agenesia uterina como na Síndrome de *Rokitansky-Kuster-Hauser* e também em homens com câncer de próstata em tratamento com altas doses de estrogênio são evidências que sustentam esta teoria (Burney e Giudice, 2012);
- d) a teoria da metástase benigna defende a hipótese de que implantes endometriais ectópicos resultam da disseminação linfática ou hematogênica de células endometriais (Sampson, 1927; Burney e Giudice, 2012). Estudos da microvasculatura demonstraram o fluxo linfático do corpo uterino para o ovário, mostrando o possível papel do sistema linfático na etiologia da endometriose (Ueki, 1991). Endometriose dentro dos nódulos linfáticos tem sido documentada em um modelo de endometriose induzido em ratos e em 6 a 7 % das mulheres submetidas à linfadenectomia (Hey-Cunningham, Fazleabas *et al.*, 2011; Burney e Giudice, 2012). A presença de endometriose em locais distantes da cavidade uterina como nos pulmões, cérebro e osso corroboram com essa teoria (Burney e Giudice, 2012);
- e) a teoria da menstruação retrógrada: descrita por Sampson em 1921, parece ainda ser a mais aceita atualmente. Ela propõe o refluxo do tecido

endometrial através das tubas uterinas para o peritônio das vísceras da cavidade peritoneal. Após o refluxo este tecido se implanta e cresce dando origem ao tecido endometrial ectópico (Healy, Rogers *et al.*, 1998; Tariverdian, C. *et al.*, 2007; Baldi, Campioni *et al.*, 2008). Estudos prévios mostraram que mulheres com endometriose possuem maior quantidade de tecido endometrial no fluxo menstrual comparado a mulheres saudáveis (Healy, Rogers *et al.*, 1998; Sugino, 2007). Estudos de prevalência da menstruação retrógrada têm mostrado sua presença em acima de 90% das mulheres e há relatos de ser ainda maior naquelas portadoras de endometriose (Halme, Hammond *et al.*, 1984). Como complementação sabe-se que a obstrução do fluxo menstrual ou um fluxo mais intenso parece predispor ao desenvolvimento da doença (Groothuis, Nap *et al.*, 2005).

As características do tecido endometrial depositado na cavidade peritoneal parecem assumir importância no estabelecimento e desenvolvimento da endometriose (Malik, Day *et al.*, 2006). O endométrio adulto possui características teciduais peculiares devido à intensa proliferação, secreção, regressão e regeneração durante cada ciclo menstrual (Healy, Rogers *et al.*, 1998).

A observação de características que são inerentes ao peritônio também podem interferir nesse processo. Defeitos microscópicos podem permitir que as células contactem a matriz sub-mesotelial, onde ela prolifera, espalha e cresce, algumas vezes invadindo profundamente o espaço sub-peritoneal. Sendo assim alguns fatores provavelmente contribuem para a persistência das lesões endometrióticas dentro do peritônio neste grupo específico de pacientes que desenvolvem a doença, e estes fatores podem ser decorrentes de uma “vigilância imunológica” inadequada (I. Lebovic, M.D. *et al.*, 2001; M., Sophie *et al.*, 2003).

O papel do sistema imune na endometriose tem sido amplamente estudado e várias anormalidades têm sido identificadas (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Berkkanoglu e Arici, 2003; Kyama, Debrock *et al.*, 2003; Bedaiwy e Falcone, 2004; Dmowski e Braun, 2004; Burney e Giudice, 2012). Se essas anormalidades são a

causa ou a consequência da doença ainda não está estabelecido. Este estudo propõe avaliar a presença de possíveis marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em amostras de sangue periférico e menstrual, justamente buscando uma melhor compreensão destes marcadores na fisiopatologia desta doença, ainda não elucidados.

## 1 A ENDOMETRIOSE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A endometriose tem sido amplamente caracterizada como uma doença inflamatória (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Berkkanoglu e Arici, 2003; Kyama, Debrock *et al.*, 2003; Bedaiwy e Falcone, 2004; Dmowski e Braun, 2004; Burney e Giudice, 2012). Existem evidências substanciais de que tanto alterações da resposta imune inata quanto humoral estão presentes na gênese da doença (hiperativação macrofágica, diminuição da citotoxicidade de linfócitos T e células NK, aumento da liberação de citocinas e fatores de crescimento, neoformação vascular e aumento da ativação de fibroblastos levando à formação de fibrose (Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Lebovic, Mueller *et al.*, 2001; Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Kyama, Debrock *et al.*, 2003; Tariverdian, Theoharides *et al.*, 2007). Estudos prévios evidenciaram alterações na imunidade celular, com “vigilância imunológica” inadequada no peritônio de pacientes com endometriose (Siristatidis, Nissotakis *et al.*, 2006).

Células *Natural-Killer* (NK) lembram grandes linfócitos granulados com uma morfologia característica. Acredita-se que estas células reconheçam estruturas em glicoproteínas de alto peso molecular que aparecem na superfície das células infectadas por vírus, o que permite que elas sejam diferenciadas. Como consequência, ocorre a ativação da célula NK e a polarização dos grânulos entre o núcleo e o alvo, e a liberação extracelular do seu conteúdo no espaço entre as duas células. As células NK também podem matar ativando a apoptose (morte celular programada) (Kennephy, Paul *et al.*, 2010; Ivan e Arthur, 2011).

Evidências mostram uma diminuição da atividade e citotoxicidade das células NK contra células endometriais autólogas de pacientes com endometriose que também se correlacionam com o estágio da doença (Oosterlynck, Cornillie *et al.*, 1991; Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Dmowski e Braun, 2004). Oosterlynck, *et al.*, 1993, evidenciaram uma diminuição na citotoxicidade das células NK no fluido peritoneal de pacientes com endometriose em relação ao grupo controle. Kanzaki, *et al.*, 1992, confirmaram esses achados no soro e Ho, *et al.*, 1997 também encontraram os mesmos resultados no fluido peritoneal das pacientes com a doença

(Kanzaki, Wang *et al.*, 1992; Oosterlynck, Meuleman *et al.*, 1993; Ho, Wu *et al.*, 1997; Lebovic, Mueller *et al.*, 2001).

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas secretadas no compartimento extra-celular, principalmente por leucócitos. Elas exercem atividade autócrina, parácrina e algumas vezes efeitos endócrinos. Sua principal origem são os macrófagos, linfócitos T e neutrófilos. Os linfócitos após ativação podem originar células T citotóxicas e células T auxiliares (Dmowski e Braun, 2004; Siristatidis, Nissotakis *et al.*, 2006; Murphy, Travers *et al.*, 2010).

Evidências mostraram uma diminuição na proliferação de linfócitos no sangue periférico de pacientes com endometriose em resposta ao reconhecimento de células e antígenos endometriais (Dmowski e Braun, 2004). Steele *et al.*, 1984 mostraram um reduzido efeito citotóxico de linfócitos periféricos contra células endometriais autólogas, sugerindo uma redução na destruição de células endometriais em pacientes portadoras de endometriose (Berkkanoglu e Arici, 2003). Outros estudos não evidenciaram alterações no perfil de linfócitos periféricos (Gleicher, Dmowski *et al.*, 1984; Hill, Faris *et al.*, 1988).

Mulheres com endometriose apresentaram um aumento do número de macrófagos e linfócitos peritoneais e algumas dessas células pareciam estar ativadas (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Berkkanoglu e Arici, 2003). No entanto observa-se uma inconsistência geral dos estudos avaliando o papel dos linfócitos T na fisiopatologia da doença.

Além das alterações na imunidade mediada por células, evidências consideráveis têm indicado a existência de alterações na atividade de células B e um aumento na incidência de auto-anticorpos em mulheres com endometriose (Mathur, Peress *et al.*, 1982; Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Berkkanoglu e Arici, 2003; Dmowski e Braun, 2004). Há quase duas décadas, os estudos já haviam demonstrado a presença de depósitos de IgG e complemento no endométrio eutópico e uma redução no nível de complemento sérico total de pacientes com endometriose (Mathur, Peress *et al.*, 1982; Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Dmowski e Braun, 2004). Alguns autores especularam que essas alterações auto-imunes

poderiam interferir adversamente no processo reprodutivo dessas mulheres. Posteriormente foram identificados auto-anticorpos que reconheciam antígenos endometriais, que poderiam ser os responsáveis pela resposta imune nesta doença (Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Dmowski e Braun, 2004). Outros componentes da resposta imune humoral como C3 e fibronectina também parecem estar envolvidos no processo imunológico que contribui para o desenvolvimento da doença (Lebovic, Mueller *et al.*, 2001).

A endometriose, conforme observado em uma clássica doença autoimune, também apresenta ativação policlonal de células B, anormalidades imunológicas na função de células T e B, aumento da apoptose, dano tecidual e envolvimento de múltiplos órgãos (Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Dmowski e Braun, 2004). Entretanto existem alguns pontos que contrapõem estes fatos; como por exemplo, toda doença autoimune está associada com certos alelos de HLA, o que não ocorre na endometriose (Berkkanoglu e Arici, 2003). Logo muito ainda necessita ser esclarecido com relação à imunidade humoral e endometriose.

## 1.1 MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS

Os macrófagos descendem de promonócitos da medula óssea, que, após a diferenciação em monócitos sanguíneos, acabam por se assentarem nos tecidos sob a forma de macrófagos maduros e nestes locais constituem o sistema de fagócitos mononucleares. Estas células têm vida longa com substancial retículo endoplasmático rugoso e numerosas mitocôndrias (Murphy, Travers *et al.*, 2010; Roitt e Rabson, 2011).

O neutrófilo é o leucócito dominante na corrente sanguínea, sendo uma célula de vida curta que não se divide, com um núcleo multilobulado, uma gama de grânulos, sendo os principais:

- a) grânulos azurófilos primários, que se desenvolvem precocemente e contêm mieloperoxidase (MPO) junto com a maioria dos efetores antimicrobianos não oxidativos, incluindo defensinas, fator bactericida/permeabilidade gradual e catepsina G (Murphy, Travers *et al.*, 2010; Roitt e Rabson, 2011);
- b) grânulos secundários específicos, peroxidase-negativos, contendo lactoferrina e grande parte da lisozima, fosfatase alcalina e citocromo b558 ligado à membrana (Murphy, Travers *et al.*, 2010; Roitt e Rabson, 2011)

Os macrófagos e neutrófilos desempenham um papel crucial na resposta imunológica (Berbic, Schulke *et al.*, 2009; Murphy, Travers *et al.*, 2010; Roitt e Rabson, 2011). Zeller *et al.*, 1987, evidenciaram um estado hiperativo de monócitos periféricos em pacientes com endometriose, porém sem alterações na contagem de monócitos entre pacientes portadoras e não portadoras de endometriose (Vinatier, Dufour *et al.*, 1996).

Entretanto outros estudos mostraram alterações na contagem e ativação de macrófagos e neutrófilos no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Hornung, Ryan *et al.*, 1997; Tariverdian, Theoharides *et al.*, 2007; Garzetti, *et al.*, ). A hiperatividade dessas células está associada a um aumento na liberação de seus

produtos, como fatores de crescimento, citocinas, o que pode alterar a sobrevivência e crescimento do tecido endometrial ectópico (Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Sidell, Wai Han *et al.*, 2002; Kyama, Debrock *et al.*, 2003). Os macrófagos e neutrófilos sequestrados na cavidade peritoneal de pacientes com endometriose em condições basais e de estimulação produzem níveis mais altos de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, e IL-10, que em pacientes saudáveis (Dmowski e Braun, 2004; Burney e Giudice, 2012).

Uma das principais funções do macrófago e neutrófilo é a fagocitose, diante da invasão de um corpo estranho ou quando diante de debris celulares ou células apoptóticas. Vários receptores de superfície e um grande número de fatores como citocinas, glicocorticoides, lipopolissacarídeos, interferons, fatores estimuladores de colônia de macrófagos estão envolvidos nesta função (Murphy, Travers *et al.*, 2010; Roitt e Rabson, 2011). Estes fatores são encontrados em níveis anormais no fluido peritoneal de pacientes com endometriose, podendo ser outro mecanismo permissivo para o desenvolvimento dos implantes endometrióticos (Sidell, Wai Han *et al.*, 2002; Berkkanoglu e Arici, 2003; Berbic, Schulke *et al.*, 2009).

Os macrófagos e neutrófilos desempenham um papel importante na destruição tecidual, reparo e regeneração endometrial durante a fase menstrual e proliferativa do ciclo (Salamonsen e Lathbury, 2000; Critchley, Kelly *et al.*, 2001; Hilary, Rodney *et al.*, 2001; King e Critchley, 2010). Nesse estágio, em pacientes com endometriose, fragmentos endometriais viáveis poderiam escapar a “vigilância imunológica” e implantarem-se em sítios ectópicos (Beric, Schulke *et al.*, 2009).

Por outro lado, controvérsias existem na literatura com relação à população de leucócitos no endométrio, se estão aumentados ou diminuídos na fase proliferativa do ciclo no endométrio eutópico de pacientes com endometriose. Um estudo avaliando a população de macrófagos mostrou redução da mesma durante a fase proliferativa precoce, com nenhuma diferença durante os estágios tardios do ciclo (Braun, Ding *et al.*, 2002). Outros trabalhos mostraram aumento na população de macrófagos durante as fases proliferativa e secretória do ciclo menstrual em pacientes com endometriose (Khan, Masuzaki *et al.*, 2004). Vale relatar que algumas pesquisas identificaram um aumento na população macrofágica em toda a fase

proliferativa do ciclo, comparado a controles normais, mostraram também um aumento da densidade de macrófagos em mulheres sem endometriose durante a fase médio/menstrual do ciclo, em contrapartida ao declínio gradual da densidade de macrófagos através da fase menstrual nas pacientes com a doença (Braun, Ding *et al.*, 2002; Berbic, Schulke *et al.*, 2009).

Evidências indiretas sugerem mudanças na população de macrófagos no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Vinatier, Dufour *et al.*, 1996; Tariverdian, Theoharides *et al.*, 2007). Dentre elas o aumento do fator inibidor da migração de macrófagos durante a fase proliferativa e aumento do MCP-1 (monocyte/macrophage activating chemoattractant protein) nas fases proliferativa e secretória. Estes fatores poderiam respectivamente evitar a migração randômica de macrófagos e assegurar o recrutamento de macrófagos no endométrio (Braun, Ding *et al.*, 2002; Berbic, Schulke *et al.*, 2009).

Muito ainda necessita ser esclarecido com relação ao papel da população de macrófagos e neutrófilos no tecido endometrial e qual seria o seu papel na fisiopatologia da endometriose.

### **1.1.1 N-Acetyl- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG)**

N- Acetyl- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) é uma proteína/enzima relacionada com o processo inflamatório. NAG é uma enzima lisossomal que mede a infiltração de mononucleares, presente em altos níveis na hiperatividade macrofágica. Alguns estudos têm utilizado esta enzima como marcador indireto do acúmulo de macrófatos ativados (Wang, Cornillie *et al.*, 1999; Xavier, Amaral *et al.*, 2010; Lopes E Lages, Belo *et al.*, 2011; Lamaita, Pontes *et al.*, 2012).

Nesse sentido, Lamaita *et al.*, 2012 avaliando a atividade de NAG no fluido folicular e sangue periférico de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose evidenciaram um maior nível de atividade desta enzima em amostras de sangue periférico e líquido folicular, mostrando uma maior atividade macrofágica em ambas amostras das mulheres portadoras de endometriose.

Concluiu-se portanto que o estado de hiperativação macrofágica em mulheres portadoras de endometriose teria um efeito estimulatório no tecido endometriótico, embora na população normal esta hiperatividade macrofágica parece inibir a proliferação endometrial local (Lamaita, Pontes *et al.*, 2012). Encontramos publicados na literatura estudos avaliando NAG no soro e líquido folicular (Lamaita, Pontes *et al.*, 2012) e fluido peritoneal de mulheres com endometriose (Brandeli e Passos, 1998). Entretanto, até onde sabemos, atividade de NAG em sangue menstrual de pacientes portadoras de endometriose não foi avaliada.

### 1.1.2 Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) desempenha um papel importante na trilha oxidativa de monócitos e neutrófilos por produzir ácido hipoclorídrico (de peróxido de hidrogênio e íons cloro) com função antimicrobiana e como enzima de vários substratos produzindo intermediários reativos e consumindo peróxido de hidrogênio. Desempenha o papel de oxidar LDL, inativar o inibidor de protease, ativar carcinógenos e consumir ácido nítrico, contribuindo para disfunção endotelial e avaliação da presença de neutrófilos (Riley, Moen *et al.*, 2007; Xavier, Amaral *et al.*, 2010; Lopes E Lages, Belo *et al.*, 2011; Lamaita, Pontes *et al.*, 2012).

Desta forma essa enzima tem sido amplamente usada como um marcador de resposta inflamatória e estresse oxidativo, pois mede o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares em amostras teciduais (Riley, Moen *et al.*, 2007; Xavier, Amaral *et al.*, 2010; Lopes E Lages, Belo *et al.*, 2011; Lamaita, Pontes *et al.*, 2012).

Entretanto, um trabalho avaliando a atividade de MPO em sangue periférico e fluido folicular de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose evidenciou uma atividade mais baixa de MPO no fluido folicular de mulheres portadoras da doença mas sem diferença no nível sérico entre os grupos. Esta baixa atividade de MPO no líquido folicular poderia estar relacionada a alterações na foliculogênese e ovulação encontradas na endometriose (Lamaita, Pontes *et al.*, 2012).

Tem sido descrito que um polimorfismo funcional no gene promotor de MPO -463G/A estaria associado a uma maior incidência ou severidade de algumas doenças inflamatórias como, doença de Alzheimer, aterosclerose, e alguns tumores (Hsieh, Chang *et al.*, 2004). Estes autores avaliando o risco de endometriose associado ao polimorfismo genético do gene MPO, em amostras de sangue periférico, não evidenciou alterações relacionadas à susceptibilidade para a doença.

Todavia, não encontramos após busca nas bases pesquisadas, trabalhos na literatura avaliando a atividade de MPO no sangue menstrual de pacientes portadoras de endometriose.

## 1.2 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )

Várias citocinas pró-inflamatórias quimiotáticas para monócitos, macrófagos e granulócitos têm sido identificadas no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Berkkanoglu M, 2003; M., Lutgart *et al.*, 2006). Os TNFs são citocinas pleiotróficas com um alcance de efeitos benéficos e deletérios dependendo da sua quantidade produzida, de sua localização tecidual, sua atividade local ligando-se a proteínas e do seu efeito como citocina ou hormônio (Lebovic, Mueller *et al.*, 2001).

Neutrófilos, macrófagos, linfócitos ativados, células NK e várias células não hematopoiéticas produzem TNF- $\alpha$  enquanto o TNF- $\beta$  é produzido por linfócitos. A princípio, esses TNFs foram identificados por sua capacidade de induzir apoptose, mas atualmente sabe-se da sua capacidade de iniciar a cascata de citocinas e outros fatores associados com a resposta inflamatória (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Siristatidis, Nissotakis *et al.*, 2006).

A secreção de TNF por células epiteliais “in vitro” é aumentada pelo efeito de IL-1, e também modulada pela progesterona e proteína plasmática-14. O TNF- $\alpha$  tem sido identificado em alguns estudos por aumentar a aderência de células estromais cultivadas às células mesoteliais. Este achado sugere que a presença de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal de pacientes com endometriose poderia facilitar a aderência do tecido endometrial ectópico ao peritônio (Bullimore, 2003; Kyama, Overbergh *et al.*, 2006). Existem evidências que contrapõem estas características (Debrock, De Strooper *et al.*, 2006). Todavia, vários pesquisadores têm relatado aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Berkkanoglu e Arici, 2003; Bullimore, 2003; Kyama, Overbergh *et al.*, 2006).

No endométrio humano, o TNF- $\alpha$  tem sido implicado na fisiologia normal da proliferação e descamação endometrial (Kharfi, Labelle *et al.*, 2003; Bedaiwy e Falcone, 2004). A maior expressão de sua proteína e RNA mensageiro ocorre em células epiteliais, principalmente na fase secretória e menstrual do ciclo. Acredita-se

que esta citocina tenha um importante papel na morte e necrose tecidual durante o período menstrual (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Kharfi, Labelle *et al.*, 2003). O TNF- $\alpha$  também está presente nas células estromais, predominantemente na fase proliferativa do ciclo, sugerindo uma diferenciação por localização e que é regulada por ação hormonal (Lebovic, Mueller *et al.*, 2001).

O TNF- $\alpha$  exerce sua função no endométrio humano através de dois receptores de superfície celular; o tipo 1 (TNF RI) e o tipo 2 (TNF RII). Estes receptores são codificados por diferentes genes e são capazes de mediar sinais celulares distintos. Não se sabe se o receptor tipo1 ou 2 está envolvido na mediação do efeito citotóxico do TNF- $\alpha$ . Entretanto, um trabalho mostrou uma relação inversa entre o TNF- $\alpha$  e o receptor tipo1 durante ciclo menstrual, enquanto que o receptor tipo2 apresenta-se aumentado em 10 a 100 vezes no endométrio em relação ao TNF- $\alpha$  (Chegini, Dou *et al.*, 1999). Além disso, o TNF- $\alpha$  parece ainda poder desempenhar um efeito que estimula mitose/proliferação no receptor tipo1 e não no tipo2 (Ininns, Gatanaga *et al.*, 1992).

O receptor tipo2 parece também estar envolvido na indução da fragmentação do DNA induzido por TNF- $\alpha$ , sugerindo que a trilha sinalizadora de apoptose no endométrio esteja relacionada com o receptor tipo2 (Tabibzadeh, Zupi *et al.*, 1995; Kharfi, Labelle *et al.*, 2003). Um estudo avaliando os níveis de Ácido Ribonucleico Mensageiro (RNAm) dos receptores tipo 2 no endométrio de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose evidenciou níveis reduzidos deste receptor, tanto nas células estromais quanto nas glandulares de pacientes com a doença. Nota-se que uma deficiência neste receptor poderia conduzir a uma deficiência na citotoxicidade e efeito apoptótico induzido pelo TNF- $\alpha$ , favorecendo o desenvolvimento ectópico do tecido endometrial (Kharfi, Labelle *et al.*, 2003).

Além disso, uma outra pesquisa mostrou níveis elevados de TNF- $\alpha$  RNAm no endométrio na fase menstrual do ciclo de mulheres portadoras de endometriose, comparado ao grupo controle, sugerindo que somente um endométrio com atividade inflamatória relevante seria capaz de implantar-se (Kyama, Overbergh *et al.*, 2006; May, Villar *et al.*, 2011).

Logo os achados são muito controversos com relação ao papel do TNF- $\alpha$  no endométrio e na endometriose, o que precisa ser elucidado.

### 1.3 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL

Angiogênese é desenvolvimento de novos vasos à partir daqueles pré-existentes, um mecanismo importante tanto em condições fisiológicas quanto para o desenvolvimento de doenças. Este é um processo crucial para o implante do tecido endometriótico, que assim como nos casos das metástases tumorais, também necessitam neovascularização para o suprimento de nutrientes e oxigênio (Laschke e Menger, 2007).

Várias moléculas são importantes para a angiogênese, mas o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, também conhecido como VEGF-A) e os membros da sua família (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento derivado de placenta PlGF) com seus receptores correspondentes (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) são considerados fatores chave neste processo (Michaloski, Redondo *et al.*; 2016). O VEGF é uma glicoproteína com potencial mitogênico para células endoteliais, indutor da permeabilidade vascular e com função quimiotática para monócitos (Donnez, Smoes *et al.*, 1998). O VEGF é um dos mais potentes e mais estudados fatores angiogênicos, sendo produzido por monócitos, macrófagos e células musculares lisas. Este fator liga-se à família dos receptores da tirosina quinase, incluindo VEGFR1(Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1/KDR), conduzindo à formação de dímeros, autofosforilação do receptor e ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Berkkanoglu e Arici, 2003; Girling e Rogers, 2005; Laschke, Elitzsch *et al.*, 2006; Machado, Berardo *et al.*, 2010).

Há evidências de que a proteína do VEGF está localizada predominantemente nas glândulas endometriais e que o estradiol aumenta a expressão do gene VEGF no endométrio humano normal (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Girling e Rogers, 2005; Rogers, Donoghue *et al.*, 2009; Taylor, Yu *et al.*, 2009). Condições tais como hipóxia, presença de IL-1, de fator de crescimento

derivado de plaquetas, de TGF- $\beta$ , de fator de crescimento epidermal e prostaglandina E2, conduzem ao aumento da expressão de VEGF (Berkkanoglu e Arici, 2003).

Inúmeros estudos têm mostrado que a angiogênese provavelmente exerça um papel importante na fisiopatologia da endometriose (Donnez, Smoes *et al.*, 1998; Healy, Rogers *et al.*, 1998; Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Girling e Rogers, 2005; Groothuis, Nap *et al.*, 2005; Siristatidis, Nissotakis *et al.*, 2006; Rogers, Donoghue *et al.*, 2009; Mabrouk, Elmakky *et al.*, 2012). À videolaparoscopia, a maioria das lesões endometrióticas parece estar envolvida por vasos sanguíneos peritoneais (Healy, Rogers *et al.*, 1998; Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Groothuis, Nap *et al.*, 2005). Além disso estudos histológicos de experimentos em animais têm mostrado que os depósitos endometrióticos derivam seu suprimento sanguíneo da microvasculatura circunvizinha e que os maiores depósitos crescem em áreas com suprimento vascular abundante, além do que os depósitos endometrióticos vascularizados são mais ativos (Healy, Rogers *et al.*, 1998).

A Integrina  $\alpha\beta 3$  é um marcador angiogênico, cuja expressão em células endoteliais da microvasculatura humana está aumentada pelo fator de crescimento fibroblástico básico (b FGF). (Healy, Rogers *et al.*, 1998; Vinatier, Orazi *et al.*, 2001).

Uma pesquisa avaliando a porcentagem de vasos endometriais expressando integrina  $\alpha\beta 3$  e o índice proliferativo médio do endométrio eutópico mostrou que ambos foram significativamente maior naquelas pacientes com endometriose em relação aos controles (Healy, Rogers *et al.*, 1998; Vinatier, Orazi *et al.*, 2001).

Quando avaliada por imunohistoquímica, a proteína do VEGF mostrou maior expressão durante a fase secretória tardia do endométrio de pacientes portadoras de endometriose. Durante a fase lútea, níveis significativamente mais altos de expressão de VEGF foram observados em ambos; epitélio glandular e estromal de lesões endometrióticas vermelhas, quando comparadas às lesões escuras, sugerindo um processo angiogênico ativo nas lesões vermelhas como no endométrio eutópico (Kokorine, Eeckhout *et al.*, 1997; Donnez, Smoes *et al.*, 1998; Siristatidis, Nissotakis *et al.*, 2006).

O VEGF além de ser um fator angiogênico, causa aumento na permeabilidade do leito capilar, permitindo o extravasamento de produtos da fibrina no espaço extra-celular que recrutam macrófagos (Leyendecker, Kunz *et al.*, 1998) Esses por sua vez secretam TNF- $\alpha$  e IL-6, na presença dos produtos da fibrina, que também aumentam a atividade angiogênica de macrófagos (Donnez, Smoes *et al.*, 1998).

Durante sua evolução, as lesões vermelhas induzem uma reação inflamatória, provocando sangramento, escarificação, fagocitose de hemossiderina e as lesões tornam-se escuras. A diminuição da vascularização nas lesões durante o curso natural segue a diminuição observada do VEGF (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001).

## 2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A MENSTRUÇÃO

O conceito de que a menstruação surge como resultado de um processo inflamatório foi primeiramente postulado por Finn (1986) e tem ganhado considerável credibilidade por um grande número de trabalhos publicados (Critchley, Kelly *et al.*, 2001; Kelly, Kung *et al.*, 2001; Groothuis, Nap *et al.*, 2005; King e Critchley, 2010; Maybin, Critchley *et al.*, 2011).

Essa hipótese foi originalmente baseada nas características apresentadas pelo endométrio durante a fase secretória tardia; edema tecidual, influxo de células migratórias e a presença de células decíduais, as quais têm características representativas de fibroblastos teciduais de granulação (Critchley, Kelly *et al.*, 2001).

Existem evidências para o papel dos leucócitos na biologia normal do endométrio humano particularmente no processo de remodelamento, implantação e menstruação (Salamonsen e Lathbury, 2000; Critchley, Kelly *et al.*, 2001; Kelly, Kung *et al.*, 2001).

A reparação tecidual do endométrio se inicia precocemente, aproximadamente 36 horas após o início do sangramento menstrual, enquanto que a quebra tecidual ainda persiste enfatizando a peculiaridade do processo de degradação e reparo (Salamonsen e Lathbury, 2000).

A regeneração epitelial a partir das criptas glandulares se inicia primeiro, seguido pelo espessamento do estroma e mitose do endotélio que se inicia por volta do quarto ou quinto dia. Dado à abundância de leucócitos teciduais neste período é de grande probabilidade que eles contribuam no processo de regeneração (Salamonsen e Lathbury, 2000).

Vale notar ainda que macrófagos são responsáveis em alguma extensão pela remoção de detritos. O processo de cura da ferida, em geral parece ser iniciado por citocinas, fatores de crescimento e plaquetas e células inflamatórias recrutadas, particularmente macrófagos e neutrófilos, que produzem estes fatores necessários no processo da cura da ferida. Por sua vez, em particular os macrófagos, produzem nos locais de reparação de ferida TGF- $\alpha$ , fatores de crescimento de fibroblastos

(FGFs), fator derivado de crescimento de plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), TGF  $\beta$ , e ativina  $\beta$ , enquanto produtos de outros leucócitos podem ativar macrófagos (Martin, 1997; Salamonsen e Lathbury, 2000; Groothuis, Nap *et al.*, 2005).

Devido à marcante diferença no tecido endometrial entre as espécies e à dificuldade em estudar o endométrio humano, estudos críticos fornecendo evidências para a contribuição das células inflamatórias nas funções acima descritas são difíceis de serem realizados.

Sendo assim, há uma necessidade de compreensão deste processo inflamatório de descamação e reparação tecidual, dado que muitas alterações de sangramento, doenças como endometriose podem ser decorrentes de alterações no mecanismo de reparo do tecido endometrial (Salamonsen e Lathbury, 2000; Critchley, Kelly *et al.*, 2001; Kelly, Kung *et al.*, 2001; King e Critchley, 2010; Maybin, Critchley *et al.*, 2011).

### 3 FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

O endométrio eutópico de mulheres com endometriose compartilha diferenças com o endométrio ectópico que não estão presentes no endométrio de pacientes saudáveis, sugerindo que o defeito primário poderia estar no endométrio eutópico ou útero (Garzetti, Ciavattini *et al.*, 1998; Leyendecker, Kunz *et al.*, 1998; Burney e Giudice, 2012).

As células oriundas do endométrio alterado teriam maior potencial para implantação e crescimento na superfície peritoneal, permitindo o desenvolvimento da endometriose (Garzetti, Ciavattini *et al.*, 1998; Healy, Rogers *et al.*, 1998; Leyendecker, Kunz *et al.*, 1998; Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Burney e Giudice, 2012). Uma anormalidade constitucional ou adquirida na natureza dos antígenos expressados pelo endométrio poderia explicar a resistência à citotoxicidade dos Linfócitos T, mas também a geração de anticorpos. Neste contexto ressalta-se que têm sido identificados alguns anticorpos dirigidos contra antígenos endometriais (Mathur, Peress *et al.*, 1982; Vinatier, Dufour *et al.*, 1996).

Tecidos endometrióticos podem apresentar uma síntese e liberação aberrante de várias citocinas envolvidas no crescimento celular e reação inflamatória. A resposta do tecido endometriótico às citocinas, em particular IL-1 e TNF-alfa pode ser mais intensa e com maior liberação de MCP-1 (proteína 1 quimioatrativa de monócito), citocina envolvida no recrutamento e ativação de macrófagos (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001).

Um estudo que avaliou a população macrofágica durante o ciclo menstrual sugere um aumento do número de macrófagos durante a fase médio-menstrual do ciclo em controles normais, esse aumento macrofágico poderia desempenhar um papel em iniciar a apoptose e remoção de debris menstruais, como também poderia dar suporte ao reparo e regeneração do tecido endometrial (Berbic, Schulke *et al.*, 2009). Durante a menstruação, os macrófagos desempenham um papel crucial na destruição inflamatória, entretanto este processo poderia estar ocorrendo de maneira ineficiente nas pacientes com endometriose, onde a população macrofágica

declina através da fase menstrual do ciclo (Braun, Ding *et al.*, 2002; Berbic, Schulke *et al.*, 2009). Corroborando com esta teoria, Braun *et al.*, 2002, mostraram uma reduzida população macrofágica no endométrio de pacientes com endometriose na fase secretória do ciclo, coincidindo com uma reduzida apoptose tecidual local.

Mudanças na densidade de macrófagos através do ciclo menstrual em mulheres com e sem endometriose provavelmente mostram um alto grau de variabilidade em macrófagos e expressão de outras células imunes e citocinas (Beric, Schulke *et al.*, 2009; Burney e Giudice, 2012).

É difícil especular quais mudanças estão ocorrendo na população de macrófagos e neutrófilos em pacientes com endometriose, em termos de ativação e função. Tem-se proposto que na endometriose os macrófagos encontrariam moléculas, tais como haptoglobina, que poderiam alterar sua função fagocítica. Consequentemente ao invés de agirem como fagócitos que erradicam fragmentos de células endometriais em condições normais, eles não só permitiriam a sobrevivência destas células como também secretariam uma ampla variedade de mediadores que promoveriam sua habilidade para implantar e proliferar em locais ectópicos (Sidell, Wai Han *et al.*, 2002; Berbic, Schulke *et al.*, 2009).

Células epiteliais e do estroma endometrial “*in vitro*” podem aderir à superfície mesotelial intacta do peritônio com invasão através do mesotélio ocorrendo em menos que dezoito a vinte e quatro horas (Malik, Day *et al.*, 2006). As células endometriais expressam moléculas de adesão (integrinas), em sua superfície permitindo sua adesão ao peritônio.

Após a disseminação do tecido endometrial seguindo a menstruação, o progresso para a condição de endometriose segue vários passos: refluxo, adesão, proteólise, proliferação, angiogênese e cicatrização (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Groothuis, Nap *et al.*, 2005).

O ambiente peritoneal da maioria das mulheres é capaz de reabsorver o tecido endometrial no fim do período menstrual. As pacientes com endometriose, provavelmente apresentam esse sistema ineficiente. Essa incapacidade poderia resultar de alterações no próprio endométrio ou de várias anormalidades presentes

no ambiente peritoneal (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Sidell, Wai Han *et al.*, 2002; Burney e Giudice, 2012).

Conforme as evidências apresentadas, o conhecimento atual sugere uma importante alteração na resposta imunológica de pacientes com endometriose (Lebovic, Mueller *et al.*, 2002; Dmowski e Braun, 2004; Siristatidis, Nissotakis *et al.*, 2006; Carlos, Torres *et al.*, 2009). Dessa forma, podemos pressupor que estudos sobre a base imunológica da doença poderão contribuir muito para avaliação da susceptibilidade, fisiopatologia, diagnóstico precoce e propostas terapêuticas (Vinatier, Orazi *et al.*, 2001; Berkkanoglu e Arici, 2003; Dmowski e Braun, 2004; Tariverdian, Theoharides *et al.*, 2007). Alguns estudos têm avaliado as mudanças na resposta imunológica dentro do endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose e os resultados são controversos (Donnez, Smoes *et al.*, 1998; Kharfi, Labelle *et al.*, 2003; Kyama, Overbergh *et al.*, 2006; Berbic, Schulke *et al.*, 2009; Carlos, Torres *et al.*, 2009; May, Villar *et al.*, 2011). Pouquíssimos trabalhos têm pesquisado o sangue menstrual de pacientes com a doença (Takahashi, Nagata *et al.*, 1990; Takahashi, Nagata *et al.*, 1998; Print, Valtola *et al.*, 2004; Malik, Day *et al.*, 2006; Khan, Kitajima *et al.*, 2010).

Aparentemente, o endométrio de mulheres com endometriose difere do endométrio das mulheres normais, apresentando aberrações intrínsecas fundamentais na fisiopatologia da doença. Observam-se alterações na estrutura, proliferação, componentes do sistema imunológico, moléculas de adesão, enzimas, síntese e resposta aos esteróides, citocinas, expressão gênica, síntese protéica e fatores relacionados à angiogênese (Sharpe-Timms e Kl., 2002).

Um dos maiores desafios atuais é o desenvolvimento de métodos diagnósticos não invasivos para a doença. O sangue menstrual oferece oportunidade única de diagnóstico visto que contém elementos descamados do endométrio e já se mostrou útil no diagnóstico de hemorragia uterina disfuncional (Reis, Nascimento *et al.*, 2007). O estudo de marcadores inflamatórios presentes no endométrio e sangue menstrual dessas mulheres apresenta oportunidade única para tentar compreender a fisiopatologia da doença.

Baseado na teoria de que a menstruação retrógrada é o evento chave para o desenvolvimento da endometriose, que alterações no reparo do tecido endometrial poderiam estar relacionadas com a fisiopatologia da doença e que alterações inerentes ao próprio sangue menstrual poderiam permitir o desenvolvimento e progressão do tecido endometrial ectópico, este trabalho propõe avaliar o sangue menstrual de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose assim como comparar amostras de sangue menstrual com o sangue periférico dos casos e dos controles. Para essa avaliação, os marcadores da resposta imunológica e angiogênese NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF foram usados.

Após extensa revisão da literatura em busca de trabalhos pesquisando o fluido menstrual e endometriose, dois estudos foram encontrados avaliando a presença de VEGFA no sangue menstrual de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose que não mostraram diferenças entre os grupos (Print, Valtola *et al.*, 2004; Malik, Day *et al.*, 2006).

Para nosso conhecimento, não existem estudos avaliando a presença de NAG, MPO e TNF- $\alpha$  no sangue menstrual de pacientes com endometriose.

Dessa forma, o atual estudo propõe avaliar a presença de possíveis marcadores da resposta inflamatória e angiogênese (NAG, MPO, TNF- $\alpha$ , VEGF) no sangue periférico e menstrual de mulheres portadoras e não portadoras de endometriose numa tentativa de identificá-los no sangue menstrual e avaliar o seu possível papel na fisiopatologia da doença.

## **4.OBJETIVO**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a presença de possíveis marcadores da resposta inflamatória e de angiogênese no sangue menstrual e periférico de mulheres portadoras e não portadoras de endometriose, sendo o diagnóstico confirmado ou excluído por cirurgia e/ou exame histopatológico.

#### **4.1.1 Objetivos específicos**

Comparar os níveis de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF nas amostras de sangue menstrual e periférico de pacientes com endometriose, avaliando o possível papel destes marcadores de resposta inflamatória e angiogênese em nível local e periférico

Comparar os níveis de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF nas amostras de sangue menstrual e periférico no grupo controle, avaliando o possível papel destes marcadores de resposta inflamatória e angiogênese em nível local e periférico

Avaliar a correlação entre os marcadores NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF nas amostras de sangue menstrual e periférico.

Comparar os níveis NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF nas amostras de sangue menstrual e periférico entre os grupos de pacientes sintomáticas para dor pélvica, dispareunia e infertilidade e as pacientes assintomáticas em toda amostra, portadoras e não portadoras de endometriose.

## **5 PACIENTES E MÉTODOS**

### **5.1 PACIENTES**

Este foi um estudo transversal realizado em 22 mulheres portadoras e não portadoras de endometriose durante o período de fevereiro de 2011 a dezembro de 2012.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP, parecer nº, ETIC 0661.0.203.000-11.

Todas as pacientes alocadas para o estudo concordaram em participar do mesmo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido sobre o projeto de pesquisa em acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde

#### **5.1.1 Critérios de Inclusão**

Pacientes no período da menacme, com ciclos menstruais regulares nos últimos seis meses antecedentes à data da coleta, em controle nos ambulatórios de Dor Pélvica Crônica e/ou Infertilidade do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), portadoras e não portadoras de endometriose.

Diagnóstico de endometriose confirmado ou excluído por laparotomia /videolaparoscopia conforme os critérios da ESHRE (Kennedy, Bergqvist *et al.*, 2005).

Pacientes sem uso de contracepção hormonal por pelo menos três meses antecedendo a data da coleta.

Pacientes com consulta ginecológica recente, excluída qualquer outra doença ginecológica que pudesse interferir na resposta inflamatória local ou sistêmica como NICs, vaginites ou vaginoses, transtornos anovulatórios, irregularidades do ciclo menstrual, usuárias de Dispositivo intra-uterino (DIU), Lupus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatóide entre outros.

Pacientes que após o esclarecimento sobre o trabalho concordassem e assinassem o termo de consentimento livre e esclarecido.

### **5.1.2 Critérios de Exclusão**

Pacientes que não estivessem em acordo com os critérios de inclusão

### **5.1.3 Grupos**

As pacientes foram divididas em dois grupos:

Grupo 1: portadoras de endometriose. Quinze (15) pacientes, sendo que três pacientes que ainda estavam aguardando a cirurgia foram excluídas do estudo. Duas pacientes, com diagnóstico confirmado por cirurgia e anátomo-patológico estavam em uso de contraceptivo hormonal no período da coleta e também foram excluídas do estudo. Para a análise das amostras foram então recrutadas 10 pacientes portadoras de endometriose, cujo diagnóstico foi realizado por visão videolaparoscópica direta das lesões, critério diagnóstico definido como “padrão ouro” pela *European Society Human Reproduction Embriology* (ESHRE) (Kennedy, Bergqvist *et al.*, 2005), entre essas 10 pacientes somente 1 não apresentava exame histopatológico confirmando o diagnóstico de endometriose. Todas preenchem os critérios de inclusão e exclusão.

Grupo 2: 7 pacientes definidas como grupo controle. Pacientes híginas, não portadoras de doenças crônicas, inflamatórias, ou de natureza infecciosa. Apresentavam ciclos menstruais regulares. O ciclo menstrual regular definido como ciclos com intervalos variando de 21 a 35 dias. (Berek 2010). Todas as pacientes estavam em controle no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais por dor pélvica crônica e/ou infertilidade, cujo diagnóstico de endometriose foi excluído por laparotomia ou videolaparoscopia, todas sem uso de contracepção hormonal por período mínimo de noventa dias ou mais, preenchendo todos critérios de inclusão e exclusão.

### 5.1.3 Cálculo amostral

Para um teste de Mann-Whitney fixando o poder do teste em 80% e o nível de significância de 5%, tem-se que o número necessário de indivíduos para os diferentes tamanhos de efeito foram:

- a) tamanho de efeito de 0,8:  $n = 26,7$  em cada grupo;
- b) tamanho de efeito de 1,2:  $n = 12,5$  em cada grupo;
- c) tamanho do efeito de 1,5:  $n = 8,44$  em cada grupo.

Para o teste de Wilcoxon foram:

- a) tamanho do efeito de 0,8:  $n = 14,97$  em cada grupo;
- b) tamanho do efeito de 1,2:  $n = 7,94$  em cada grupo;
- c) tamanho do efeito de 1,5:  $n = 5,95$ .

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para avaliar o perfil da população, a amostra avaliada não apresentou uma distribuição normal. Para comparar estatisticamente os grupos caso e controle, para as variáveis MPO, VEGF, TNF- $\alpha$  e NAG em cada tipo de sangue, periférico e menstrual, assim como para verificar se os grupos foram homogêneos em relação às variáveis IMC, Idade e Ciclo Menstrual, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, comparação entre as medianas e os intervalos interquartis (Hollander e Wolfe, 1999).

Para comparar estatisticamente o sangue Periférico com o Menstrual, para as variáveis NAG, MPO, VEGF e TNF- $\alpha$  em cada um dos grupos, Caso e Controle, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon, comparação entre medianas e os intervalos interquartis (Hollander e Wolfe, 1999).

Para fazer as correlações entre os marcadores de resposta inflamatória nas amostras de sangue menstrual e periférico foi utilizado o coeficiente de correlação Rô de Spearman. Para avaliar a presença dos sintomas dor, dispareunia e infertilidade e a possível associação dos mesmos com a resposta inflamatória foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

O nível de significância adotado no trabalho foi de 5%.

O software utilizado na análise foi GraphPad Prism 5 e IBM SPSS Statistics 21.

## 5.2 MÉTODOS

As pacientes foram recrutadas nos ambulatórios de Reprodução Humana e Endometriose e Dor Pélvica Crônica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). As pacientes alocadas foram entrevistadas pelo examinador e submetidas a uma anamnese dirigida para sintomatologia de dor pélvica crônica, sintomas gastrointestinais e urinários, presença ou não de dispareunia, histórico de infertilidade, paridade, uso atual e prévio de medicações, histórico familiar de endometriose, e passado de cirurgias abdominais.

Após a entrevista, foram submetidas ao exame ginecológico completo, exame das mamas, palpação abdominal, exame especular e toque vaginal bimanual.

Todas apresentavam exame citopatológico dentro da normalidade e atualizado, ausência de vaginite ou vaginose ao exame clínico/especular e ausência de doença inflamatória sistêmica, pela anamnese e exame físico.

A propedêutica laboratorial foi direcionada conforme a patologia investigada, dor pélvica crônica ou infertilidade. As pacientes do ambulatório de infertilidade estavam em propedêutica para Fertilização “*in Vitro*” (FIV), e seguiam o protocolo específico do setor de Reprodução Humana do HC-UFMG, para o tratamento específico. Todas as pacientes foram submetidas a exame ultrassonográfico endovaginal com preparo intestinal. As pacientes com sinais/sintomas suspeitos para doença profunda infiltrativa ou suspeita de obstrução urinária/intestinal foram submetidas à cistoscopia, colonoscopia e Ressonância Nuclear Magnética (RNM) para melhor avaliação pré-cirúrgica.

Uma vez preenchido os critérios de inclusão e exclusão as pacientes foram informadas sobre o trabalho. Aquelas que concordaram em participar do projeto, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os prontuários de todas as

pacientes do estudo foram revisados quanto ao passado de cirurgias prévias, exames anátomo-patológicos e estadiamento da doença conforme a *Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996*, (ASRM, 1996).

Preenchido os critérios de inclusão e exclusão e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido para a participação no projeto, as pacientes foram orientadas a entrar em contato com o pesquisador no primeiro dia do ciclo menstrual, e a comparecerem no hospital no dia de maior fluxo menstrual, geralmente no 2º, 3º ou 4º dia do ciclo menstrual.

### **5.2.1 Coleta das Amostras**

As amostras de sangue menstrual foram coletadas entre o 1º e o 4º dia do ciclo menstrual, com predomínio no 2º e 3º dia do ciclo. As amostras de sangue periférico foram colhidas no mesmo dia daquelas de sangue menstrual.

As pacientes foram colocadas em posição de litotomia. Por meio de espéculo vaginal, o colo uterino e o fórnice vaginal posterior foram expostos. As amostras de sangue menstrual foram aspiradas do fórnice vaginal posterior e do orifício externo do colo uterino com uma seringa de 3ml (insulina) e em seguida depositadas em ependorffs, conforme descrição da técnica por Reis et. al.,2007, e acondicionadas em garrafa térmica com gelo e levadas imediatamente ao laboratório para serem centrifugadas a 3600 rotações por minuto (rpm), durante 20 minutos, a 4º C. O sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer a – 20 ° C.

As amostras de sangue periférico foram coletadas da veia cubital mediana do membro superior direito em tubo próprio para coleta, sem anticoagulantes, acondicionadas em garrafa térmica com gelo e levadas imediatamente ao laboratório para serem centrifugadas a 3600rpm, durante 20 minutos, a 4ºC. O soro foi retirado e armazenado em freezer a – 20 ° C.

## 5.2.2 Dosagens Laboratoriais

### 5.2.2.1 Atividade de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase

Para avaliação das dosagens de NAG, 50  $\mu$ l das amostras de soro/50  $\mu$ l de fluido menstrual foram adicionadas a 150  $\mu$ l de solução gelada de Salina/Triton X-100. Esta solução foi homogeneizada no vortex por 40 segundos e centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C e o sobrenadante utilizado para dosagem de NAG.

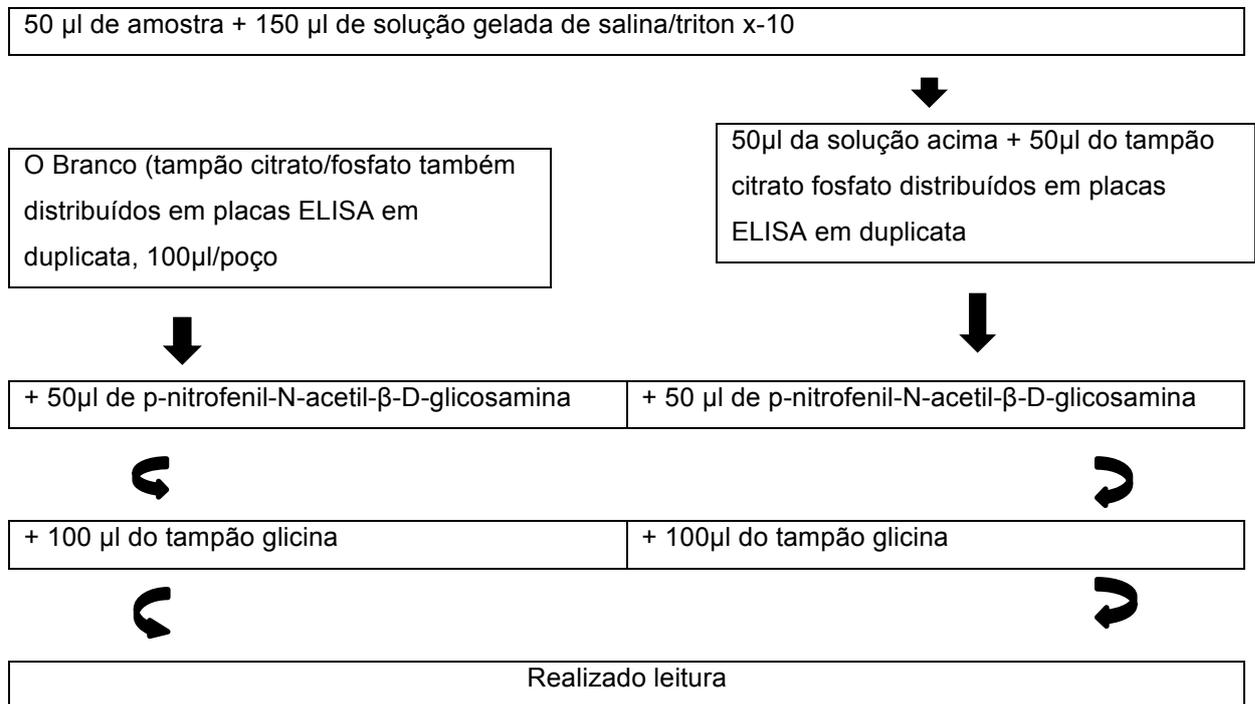
Cinquenta microlitros ( $\mu$ l) das amostras diluídas conforme descrição acima, proporção 1:1 foram adicionadas em 50  $\mu$ l de tampão citrato/fosfato e distribuídos em placas de Elisa em duplicata.

O Branco (tampão citrato/fosfato - 100 $\mu$ l/poço) também foi preparado em duplicata.

Cem microlitros do substrato (p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina) foram adicionados no Branco, nas amostras, e incubados a 37°C em estufa por 30 minutos.

Cem microlitros de tampão glicina foram acrescentados no Branco, nas amostras, na curva e então realizada a leitura. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor ELISA (Thermoplate 3200™), com comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram expressos em atividade de NAG (Absorbância em OD 400nm/ml de cada amostra). Esquema da análise representado abaixo.

## Esquema 1.



Esquema 1: Dosagem NAG

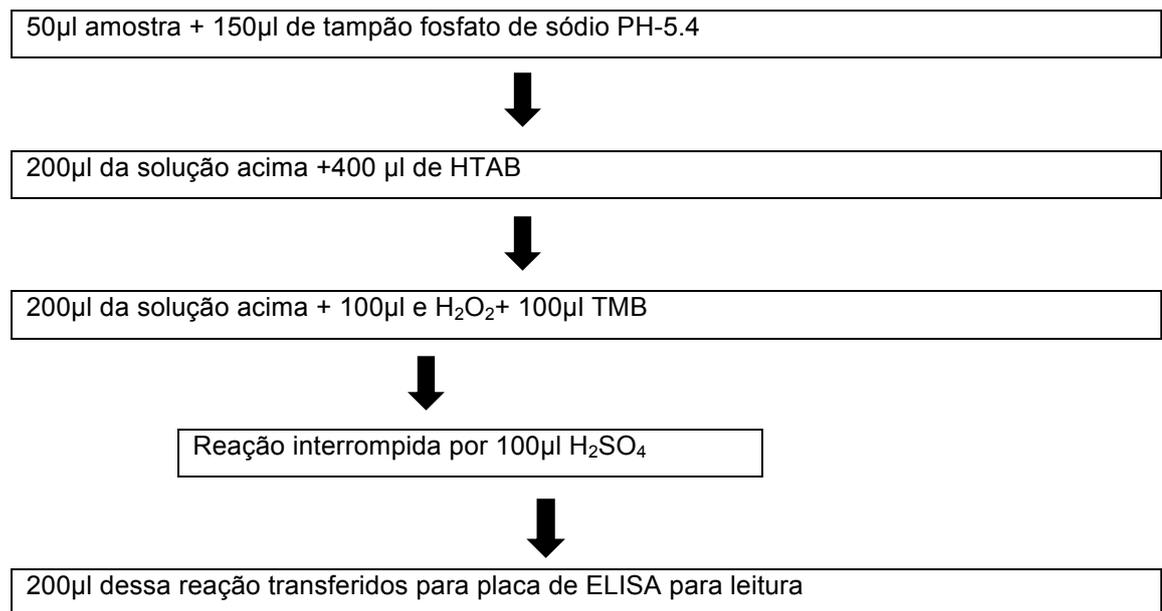
## 5.2.2.2 Atividade de Mieloperoxidase

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Para medir a atividade de MPO, 50µl de soro/50µl de fluido menstrual foram adicionadas a 150µl de tampão fosfato de sódio PH- 5,4 respectivamente e homogeneizados no vortex por 30 segundos. O ensaio segue adicionando 200 µl dessa solução a 400 µl de HTAB, proporção de 1:3. Estas amostras foram então centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, a 4°C.

Após a preparação das amostras da forma descrita acima, a seguinte reação foi realizada: 200 µl desta solução foram adicionados a 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 100µl de TMB por 1 minuto. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O próximo passo segue transferindo 200 µl da reação para placa de ELISA para leitura. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda

de 450nm pelo aparelho Thermoplate 3200™. Os resultados foram expressos em atividade de MPO (Absorbância em OD nm/ml das amostras). Esquema da análise representado abaixo.

Esquema 2.



Esquema 2: Dosagem de MPO

### 5.2.2.3 Dosagens de Fator de Crescimento Vascular Endotelial e de Fator de Necrose Tumoral alfa

Para dosagem do VEGF e do TNF- $\alpha$  foi utilizado um Kit - DuoSet - R&D Systems – ELISA. No primeiro dia a placa foi retirada da embalagem, o anticorpo de captura (100 µl/poço) foi adicionado em todos os poços. A placa foi vedada e colocada em caixa escura e úmida a 4°C em geladeira e incubada overnight.

No segundo dia o conteúdo da placa foi retirado e lavado por 5 vezes com tampão de lavagem (300µ/poço), após a última lavagem todo o líquido remanescente foi removido. O tampão de bloqueio foi em seguida adicionado a todos os poços (300µl/poço), a placa foi coberta, agitada e incubada à temperatura

ambiente por uma hora. O ensaio seguiu retirando o conteúdo da placa e esta foi lavada por 5 vezes (300µl/poço) com tampão de lavagem, todo o líquido foi removido após a última lavagem.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Elas foram então diluídas na proporção 1:3 em solução diluente para amostras (1 placa de 96 poços – PBS estéril 45 ml + BSA 1% 0,450g) e misturadas após a diluição. O Branco, os padrões e as amostras (100 µl/poço) foram então adicionados às placas e agitados. A placa foi vedada e incubada a 4°C overnight.

No terceiro dia a bancada foi preparada, o conteúdo da placa foi retirado e lavado 5 vezes (300µl/poço) com tampão de lavagem, sendo todo o líquido remanescente removido na última lavagem.

O anticorpo de detecção biotinizado (100µl/poço) foi adicionado em todos os poços, a placa foi vedada, agitada e incubada à temperatura ambiente por uma hora. Todo o conteúdo da placa foi retirado e lavado por 5 vezes (300µl/poço) com o tampão de lavagem.

O conjugado de ESTREPTAVIDINA HRP 1:200 (100µl/poço) foi adicionado em todos os poços, a placa em seguida foi vedada, agitada e incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Após todos esses passos, o conteúdo da placa foi aspirado e a mesma foi lavada mais 5 vezes com tampão de lavagem e todo conteúdo removido após a última lavagem.

O substrato OPD (100 µl/poço) foi então adicionado em todos os poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente e abrigada da luz direta durante 10 minutos. O ensaio segue adicionando-se a solução STOP - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M (.50µl) em todos os poços. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490nm pelo aparelho Thermoplate 3200™. Os resultados foram expressos em pg/ml. Esquema representativo abaixo.

## Esquema 3.

Dia 1

100µl/poço de anticorpo de captura na placa – *overnight*



Dia 2

Conteúdo retirado e lavado 5x com tampão de lavagem (300µl/poço) + tampão de bloqueio



Conteúdo retirado e lavado 5x  
com tampão de lavagem  
(300µl/poço)

Amostras 1 + (PBS estéril 45 ml + BSA 1% 0.45g)3



Acrescido Branco	Acrescido Padrão	Acrescido Amostras
------------------	------------------	--------------------

*overnight**overnight*

Dia 3



Conteúdo retirado e lavado 5x (300µl/poço) + anticorpo biotilado (100µl/poço)



Conteúdo retirado e lavado 5x (300µl/poço) + Estreptavidina HRP(1:200)



Conteúdo retirado e lavado 5x +OPD (100µl/poço)



Stoped  $H_2SO_4$  4M

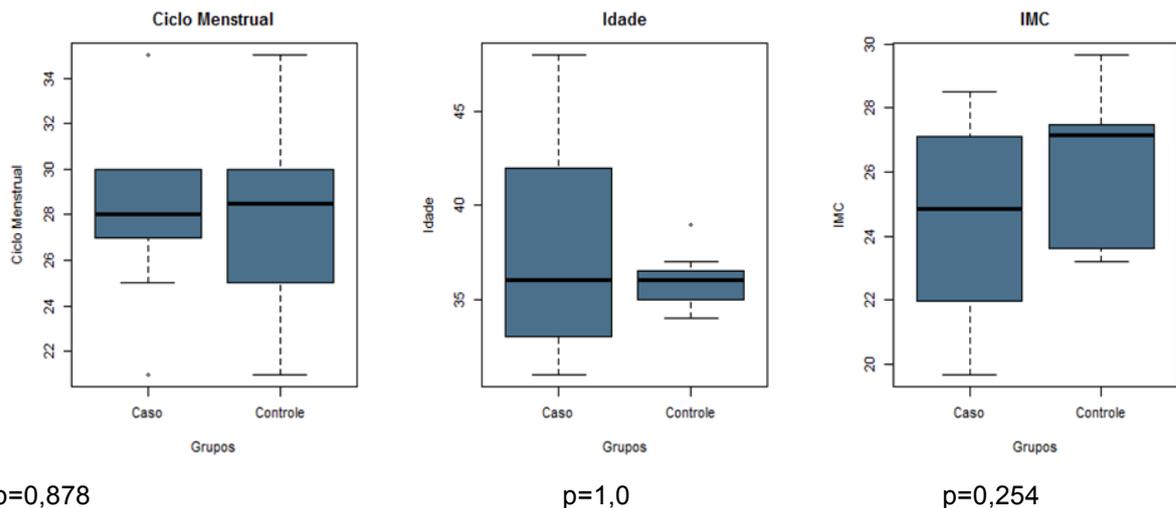
Esquema 3: Kit- Duoset - R&D Systems –ELISA.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA

O estudo incluiu pacientes do sexo feminino, na menacme, com idade variando entre 31 e 48 anos, (mediana no grupo controle de 36 anos *versus* 36 no grupo caso). O índice de massa corpórea (IMC) foi (mediana 27,17 Kg/cm<sup>2</sup>, no grupo controle *versus* 24,86 Kg/cm<sup>2</sup> no grupo caso). O ciclo menstrual variou entre 21 dias a 35 dias, (mediana de 28,5 dias no grupo controle e 28 dias no grupo caso).

Como ilustra a figura 1 e a tabela 1 a seguir, não houve diferença significativa entre as pacientes portadoras de endometriose e aquelas não portadoras da doença em relação à duração do ciclo menstrual ( $p = 0,878$ ), idade ( $p = 1,000$ ) e IMC ( $p = 0,254$ ), mostrando uma homogeneidade entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 1: Gráficos de Boxplot com erro padrão da média para ciclo menstrual, idade e IMC entre os grupos

Tabela 1

Medidas Descritivas e Teste de Mann-Whitney para Ciclo Menstrual, Idade e IMC nos Grupos Caso e Controle.

Variável	Caso	Controle	Valor p
Idade.....	36 (33 – 42)	36 (35 – 36,5)	P = 1,000
IMC.....	24,86 (21,96 – 27,12)	27,17 (23,6 – 27,48)	P = 0,254
Ciclo menstrual.....	28 (27 – 30)	28,5 (25 – 30)	P = 0,878

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: IMC = Índice de Massa Corpórea. O teste de Man-Whitney foi utilizado para avaliação das diferenças entre os grupos.

No grupo de pacientes estudadas (Tabela 2), entre as portadoras de endometriose 5 (50%) apresentavam estágio II da doença, 2 (20%) apresentavam estágio IV e 3 (30%) não possuíam anotações referente ao estadiamento em prontuário.

Na avaliação da sintomatologia presente, entre as pacientes portadoras de endometriose (casos) 9 (90%) apresentavam dor pélvica crônica, e 6 (60%) apresentavam dispareunia. Somente 1 (10%) paciente era assintomática. Entre os controles somente 1 (14%) paciente apresentava dor pélvica crônica e nenhuma apresentava dispareunia.

A infertilidade primária estava presente em 3 (30%) dos casos de endometriose, 1(10%) caso de infertilidade secundária e os demais casos, 6 (60%), não apresentavam histórico de infertilidade. Na avaliação do grupo controle, 1 (14%) apresentava infertilidade primária, 5 (71%) apresentavam infertilidade secundária, subdivididas pelas causas que se seguem: salpingotripisia bilateral 1 (14%), aderências pélvicas 3 (14%), salpingectomia bilateral 1 (14%) e 1 (14%), não apresentava histórico de infertilidade.

O período do ciclo menstrual de coleta das amostras variou entre o 2° e o 4° dia do ciclo. O maior número de coletas ocorreu no segundo dia do ciclo sendo, 4 casos e 4 controles (47%) e no terceiro dia sendo, 5 casos e 1 controle (35%). Duas

pacientes do grupo controle foram coletadas no primeiro dia (11%) do ciclo e 1 paciente do caso foi coletada no quarto dia (6%) do ciclo menstrual.

Tabela 2  
Descrição esquemática das características clínicas entre casos e controles

Variáveis	Casos	Controles
DPC.....	9 (90%)	1 (4%)
Dispareunia.....	6 (60%)	0
Assintomática.....	1 (10%)	6 (86%)
Infertilidade 1°.....	3 (30%)	1 (14%)
Infertilidade 2°.....	1 (10%)	5 (71%)
Sem infertilidade.....	6 (60%)	1 (14%)
Estadio II.....	5 (50%)	–
Estadio IV.....	2 (20%)	–
Sem estágio.....	3 (30%)	–
D1.....	0	2 (28,6%)
D2.....	4 (40%)	4 (57%)
D3.....	5 (50%)	1 (14,3%)
D4.....	1 (10%)	0

Fonte: Elaborado pela autora

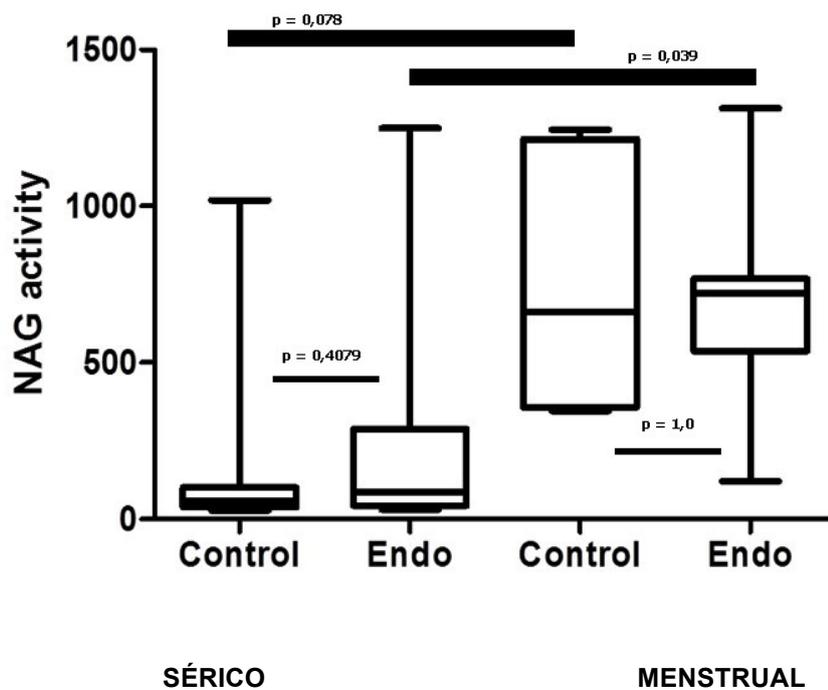
Nota: Dor pélvica crônica = (DPC), Infertilidade primária e secundária (Infertilidade 1° e 2°), Coleta no primeiro, segundo, terceiro ou quarto dia do ciclo menstrual (D1, D2, D3, D4)

## 6.2. ATIVIDADE DE N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE

A atividade de NAG nas amostras de sangue periférico não mostrou diferença entre as pacientes portadoras de endometriose e não portadoras (mediana = 85,53 *versus* 57,66 nmol/l,  $p = 0,4079$ ). Não houve diferença da atividade de NAG entre casos e controles nas amostras de sangue menstrual (mediana = 723,26 *versus* 663,62 nmol/l,  $p = 1,0$ ).

A atividade de NAG nas pacientes do grupo caso mostrou-se superior nas amostras de sangue menstrual quando comparada às amostras de sangue

periférico, sendo esta diferença significativa ( $p = 0,039$ ). A atividade de NAG nas pacientes do grupo controle também mostrou valor superior nas amostras de sangue menstrual comparadas às de sangue periférico, entretanto sem significância estatística ( $p = 0,0781$ ). (Figura 2).



Fonte: Elaborado pela autora

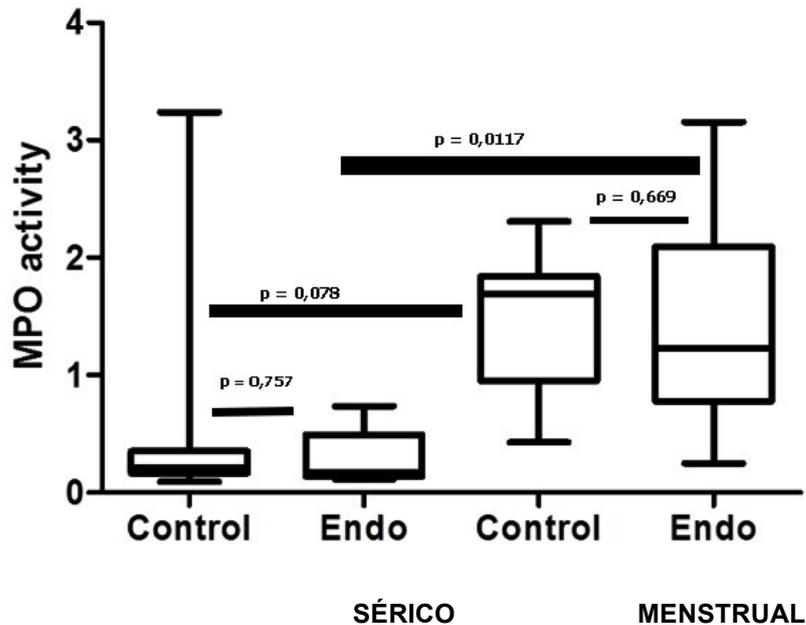
Figura 2: Gráfico de Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual, variável NAG. Atividade de NAG em nmol/ml.

Nota: Realizado teste de Mann-Whitney, para comparação de casos e controles, amostras não pareadas. Realizado o teste de Wilcoxon para análise pareada.

### 6.3 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE

A atividade de MPO nas pacientes portadoras de endometriose não se mostrou diferente daquelas pacientes não portadoras da doença nas amostras de sangue periférico (mediana = 0,168 *versus* 0,211 nm/ml, com valor  $p = 0,757$ ). A atividade de mieloperoxidase também não se mostrou diferente nas amostras de sangue menstrual entre os casos e os controles (mediana = 1,229 *versus* 1,69 nm/ml, com valor  $p = 0,669$ ).

A atividade de MPO foi superior nas amostras de sangue menstrual quando comparada às amostras de sangue periférico de pacientes portadoras de endometriose ( $p = 0,0117$ ). Comparando as amostras de sangue periférico e menstrual das pacientes não portadoras de endometriose, a atividade de MPO também foi maior nas amostras de sangue menstrual, entretanto esta diferença não teve significância estatística ( $p = 0,078$ ). (Figura 3).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 3: Gráfico de Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual para variável MPO. Atividade de MPO em nmol/ml.

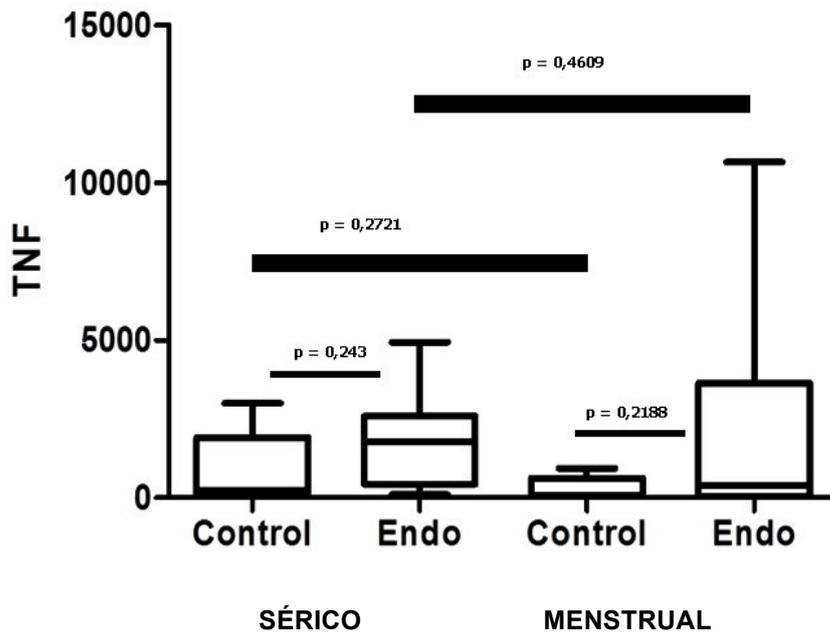
Nota: Realizado teste de Mann-Whitney para casos e controles, amostras não pareadas. Realizado o teste de Wilcoxon para análise de amostras pareadas.

#### 6.4 DOSAGEM DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

A dosagem de TNF- $\alpha$  nas amostras de sangue periférico das pacientes portadoras de endometriose e não portadoras não evidenciou diferença entre os grupos (mediana = 1765,24 *versus* 221,37 pg/ml com valor  $p = 0,243$ ). A dosagem de TNF- $\alpha$  nas amostras de sangue menstrual dos casos e dos controles não mostrou alteração significativa entre os grupos (mediana = 386,44 *versus* 56,02 pg/ml, com valor  $p = 0,2188$ ).

A dosagem de TNF- $\alpha$  nas amostras de sangue periférico quando comparadas à dosagem no sangue menstrual nas pacientes portadoras de endometriose não mostrou diferença significativa ( $p = 0,4609$ ). Da mesma forma não

foi evidenciado diferença significativa comparando a dosagem de TNF- $\alpha$  nas amostras de sangue periférico e menstrual dos controles ( $p = 0,2721$ ). (Figura 4).



Fonte: Elaborado pela autora

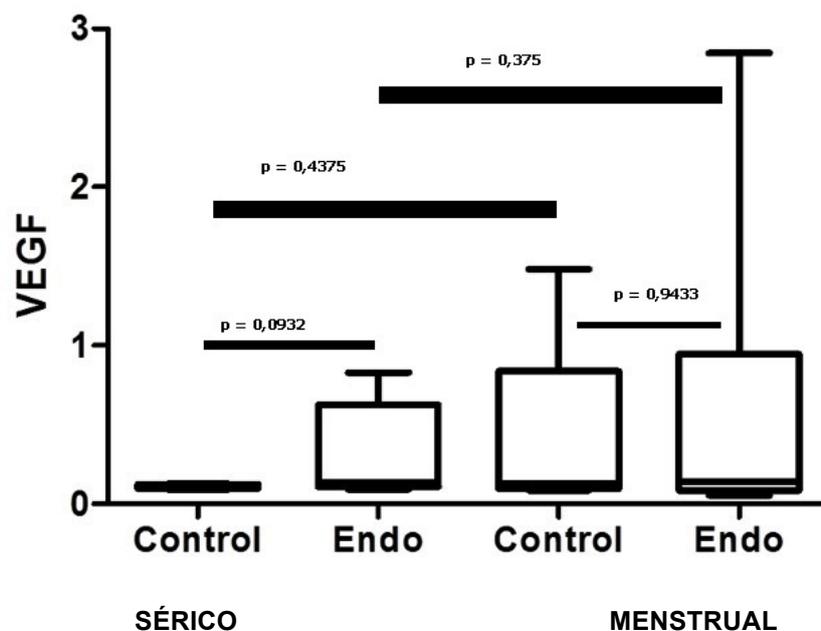
Figura 4: Gráfico de Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual para variável TNF- $\alpha$ . A dosagem de TNF- $\alpha$  em pg/ml.

Nota: Realizado teste de Mann-Whitney para comparação de casos e controles, amostras não pareadas. Realizado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

## 6.5. DOSAGEM DE FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL

A dosagem de VEGF foi superior nas amostras de sangue periférico das pacientes portadoras de endometriose quando comparada àquelas das pacientes não portadoras da doença (mediana = 0,135 *versus* 0,107 pg/ml, com valor  $p = 0,0932$ ). Entretanto esta diferença não foi significativa. A dosagem de VEGF nas amostras de sangue menstrual não evidenciou diferença estatística entre os casos e controles (com mediana = 0,142 *versus* 0,129 pg/ml, com valor  $p = 0,9433$ ).

Comparando as dosagens de VEGF nas amostras de sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras de endometriose, não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,375$ ). Da mesma forma comparando as dosagens de VEGF nas amostras de sangue periférico e menstrual das pacientes do grupo controle, não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,4375$ ). (Figura 5).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 5: Gráfico Boxplot entre grupos caso e controle para amostras de sangue periférico e menstrual para variável VEGF. A dosagem de VEGF em pg/ml.

Nota: Realizado teste de Mann-Whitney para casos e controles, amostras não pareadas. Realizado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

## 6.6 RESUMO DE ANÁLISE DAS VARIÁVEIS MPO, VEGF, TNF- $\alpha$ , NAG

Para verificar se houve diferença estatística entre os grupos caso e controle em cada tipo de sangue, periférico e menstrual, para cada uma das diferentes variáveis MPO, VEGF, TNF-  $\alpha$  e NAG, foi realizado o teste de Mann-Whitney, não sendo significativo para nenhuma das variáveis, ou seja, não existe diferença entre os grupos caso e controle dentro de cada tipo de sangue para cada uma das variáveis. A tabela 3 a seguir mostra o resumo da análise estatística.

Tabela 3

Medidas Descritivas e Teste de Mann-Whitney para as variáveis MPO, VEGF, TNF- $\alpha$  e NAG entre os grupos caso e controle em cada tipo de sangue.

Variáveis	casos	controles	valor p
NAG sérico.....	85,53 (43,52 - 286,56)	57,66 (38,17 - 101,15)	0,4079
NAG menstrual.....	723,26 (536,7 - 768,73)	663,62 (357,5 - 1214,1)	1,0
MPO sérico.....	0,168 (0,139 - 0,491)	0,211 (0,164 - 0,351)	0,757
MPO menstrual.....	1,229 (0,778 - 2,094)	1,69 (0,95 - 1,84)	0,669
TNF- $\alpha$ sérico.....	1765,2 (425,6 - 2583,8)	221,3 (0,00 - 1910,58)	0,243
TNF- $\alpha$ menstrual.....	386,4 (48,31 - 3636,06)	56,02 (10,42 - 619,205)	0,2188
VEGF sérico.....	0,135 (0,109 - 0,624)	0,107 (0,097 - 0,124)	0,093
VEGF menstrual.....	0,142 (0,087 - 0,943)	0,129 (0,097 - 0,837)	0,9433

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: MPO - mieloperoxidase, VEGF = fator vascular de crescimento endotelial, TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa. Valores = P50 (P25-P75).

## 6.7 RESUMO DA COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E MENSTRUAL NOS CASOS E NOS CONTROLES PARA AS VARIÁVEIS, MPO, VEGF, TNF- $\alpha$ E NAG

O sangue periférico e menstrual foi comparado para as diferentes variáveis MPO, VEGF, TNF- $\alpha$  e NAG em cada um dos grupos, caso e controle. O teste realizado foi o de Wilcoxon, sendo significativa para a variável NAG e MPO no grupo caso, com o valores ( $p = 0,0391$  e  $p = 0,0117$ ) respectivamente. Dessa forma, pode-se afirmar que para as variáveis NAG e MPO, no grupo caso, existe uma diferença mediana entre sangue periférico e menstrual, sendo essa diferença significativa. Veja tabela 4 a seguir.

Tabela 4

Medidas Descritivas e Teste de Wilcoxon para as diferenças entre sangue periférico e menstrual para as variáveis MPO, VEGF, TNF- $\alpha$  e NAG em cada um dos grupos.

Variáveis casos/controle	sangue periférico	sangue menstrual	valor p
NAG caso.....	85,53 (43,52 - 286,56)	723,26 (536,7 - 768,73)	0,0391
NAG controle.....	57,66 (38,17 - 101,15)	663,62 (357,5 - 1214,1)	0,078
MPO caso.....	0,168 (0,139 - 0,491)	1,23 (0,77 - 2,094)	0,0117
MPO controle.....	0,211 (0,164 - 0,351)	1,69 (0,95 - 1,84)	0,078
TNF- $\alpha$ caso.....	1765,23 (425,6 - 2583,8)	386,43 (48,3 1- 3636,06)	0,4609
TNF- $\alpha$ controle.....	221,37(0,00 - 1910,58)	56,02 (10,42 - 619,2)	0,2721
VEGF caso.....	0,135 (0,109 - 0,624)	0,142 (0,87 - 0,943)	0,375
VEGF controle.....	0,107 (0,97 - 0,124)	0,129 (0,097 - 0,837)	0,4375

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: MPO = mieloperoxidase, VEGF= fator de crescimento vascular endotelial, TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral- $\alpha$ . Dados numéricos P50 ( P25-P75), comparação entre as medianas e intervalos interquartis.

## 6.8 COMPARAÇÃO DOS SINTOMAS DE DOR, DISPAREUNIA E INFERTILIDADE COM AS VARIÁVEIS NAG, MPO, TNF- $\alpha$ E VEGF

Os sintomas de dor pélvica, dispareunia e infertilidade foram avaliados em toda a amostra. As pacientes sintomáticas e assintomáticas foram comparadas em relação aos níveis dos marcadores NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF nas amostras de sangue periférico e menstrual. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para fazer a análise entre os grupos. Este trabalho não mostrou diferença significativa na resposta inflamatória para essas variáveis específicas, comparando as pacientes sintomáticas e não sintomáticas (Tabelas 5, 6 e 7 ).

Tabela 5

Medidas descritivas e teste de Mann-Whitney para avaliação do sintoma dor pélvica e marcadores inflamatórios e angiogênicos

Sintoma	dor pélvica		
	sim	não	valor p
Marcadores			
NAG sérico.....	85,53 (45,58 – 349,32)	41,62 (29,01 – 81,02)	0,1
NAG menstrual.....	723,26 (570,38 – 769,9)	649,68 (233,02 – 1229,09)	0,598
MPO sérico.....	0,211 (0,13 – 0,69)	0,204 (0,16 – 0,288)	0,955
MPO menstrual.....	1,46 (0,95 – 2,19)	1,65 (0,599 – 1,73)	0,461
TNF- $\alpha$ sérico.....	1218,11 ( 88,72 – 2869,13)	1476,26 (123,74 – 1859,56)	0,865
TNF- $\alpha$ menstrual.....	74,56 (22,07 – 1972,24)	516,94 (42,97 – 1081,37)	0,54
VEGF sérico.....	0,122 (0,104 – 0,149)	0,116 (0,107 –)	0,693
VEGF menstrual.....	0,147 (0,087 – 0,974)	0,118 (0,107 -)	0,430

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Distribuição numérica: P50(P25-P75) para toda amostra. NAG - N-acetilglicosaminidase, MPO – mieloperoxidase, TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa, VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial.

Tabela 6

Medidas descritivas e teste de Mann-Whitney para avaliação do sintoma infertilidade e marcadores inflamatórios e angiogênicos

Sintoma	infertilidade		
Marcadores	sim	não	valor p
NAG sérico.....	41,47 (29,01 - 162,5)	60,9 (45,6 - 349,32)	0,193
NAG menstrual .....	646,64 (289,5 – 1261,43)	694,07 (649,68 - 770,5)	0,841
MPO sérico.....	0,168 (0,16 – 0,48)	0,211 (0,13 - 0,351)	0,955
MPO menstrual.....	1,68 ( 1,299 – 3,05)	1,2 (0,87 – 1,79)	0,315
TNF- $\alpha$ sérico.....	1910,6 (1014,96 – 3617,01)	746,35(26,13 – 1765,24)	0,079
TNF- $\alpha$ menstrual.....	229,24 (22,17 – 2436,41)	77,42 (26,8 – 771,92)	0,814
VEGF sérico.....	0,125 (0,095 – 0,657)	0,122 (0,106 – 0,138)	0,877
VEGF menstrual.....	0,129 (0,079 – )	0,142 (0,102 – 1,1)	0,612

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Distribuição numérica: P50 (P25 - P75) para toda amostra. NAG - N-acetilglicosaminidase, MPO – mieloperoxidase, TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa, VEGF – Fator de crescimento vascular

Tabela 7

Medidas descritivas e teste de Mann-Whitney para avaliação do sintoma dispareunia e marcadores inflamatórios e angiogênicos

Sintoma	Dyspareunia		
Marcadores	sim	não	Valor p
NAG sérico.....	154,7 (52,87 - 574,41)	51,62 (38,9 – 112,5)	0,150
NAG menstrual .....	694,07 (539,3 – 753,99)	715,88 (483,17 – 1221,6)	0,696
MPO sérico.....	0,206 (0,107 – 0,404)	0,207 (0,162 – 0,435)	0,448
MPO menstrual.....	1,26 (1,19 – 1,78)	1,67 (0,77 – 1,95)	0,922
TNF- $\alpha$ sérico.....	1491,7 (78,64 – 3385,7)	1111,3 (73,07 – 2007,6)	0,704
TNF- $\alpha$ menstrual.....	74,56 (10,14 – 1798,66)	516,94 (32,5 – 1081,4)	0,346
VEGF sérico.....	0,124 (0,107 – 0,319)	0,108 (0,104 – 0,143)	0,391
VEGF menstrual.....	0,137 (0,079 – 0,85)	0,162 (0,110 – 1,82)	0,317

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Distribuição numérica: P50 (P25 - P75) para toda amostra. NAG - N-acetilglicosaminidase, MPO – mieloperoxidase, TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa, VEGF – Fator de crescimento vascular

## 6.9 CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os marcadores de resposta inflamatória foram avaliados para uma possível correlação entre eles, comparando os níveis de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF nas amostras de sangue periférico e menstrual; para toda a amostra, portadoras e não portadoras de endometriose. O teste de correlação Rô de Spearman foi utilizado para esta análise. O teste evidenciou uma correlação linear entre o MPO sérico e o NAG sérico, com valor  $p = 0,07$   $r = 0,641$ . A análise também mostrou uma correlação positiva entre o MPO menstrual e o NAG menstrual, valor  $p = 0,01$  e  $r = 0,603$ .

## 7 DISCUSSÃO

A melhor compreensão do papel do sistema imunológico na fisiopatologia da endometriose, bem como a elucidação dos mecanismos permissivos e mantenedores desta doença é um tema de grande interesse na atualidade.

Várias teorias têm sido descritas para explicar a patogênese desta doença, mas nenhuma delas consegue isoladamente explicar de forma adequada a presença de endometriose em todas as localizações já descritas. Proposta por Sampson em 1927, a teoria da menstruação retrógrada parece ainda ser a mais aceita. O endométrio menstrual, transportado por regurgitação tubária para a cavidade pélvica implantaria-se na pelve, passando a responder à produção cíclica dos esteróides ovarianos. Aberrações intrínsecas do endométrio dessas mulheres seriam fundamentais na fisiopatologia da doença (Sharpe-Timms e Kl., 2002).

O sangue menstrual oferece oportunidade não invasiva para tentar compreender como a doença se desenvolve visto que contém elementos descamados do endométrio patológico destas mulheres. O estudo de marcadores inflamatórios e de angiogênese presentes no endométrio e sangue menstrual dessas pacientes apresenta oportunidade única para tentar compreender a fisiopatologia da doença (Sharpe-Timms e Kl., 2002; May, Villar *et al.*, 2011; Burney e Giudice, 2012).

Levando-se em conta esses fundamentos, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a presença de possíveis marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em amostras de sangue menstrual (local) e sangue periférico em pacientes portadoras e não portadoras de endometriose, tentando assim compreender melhor a fisiopatologia da doença. A análise e comparação dessas amostras teciduais foi realizada utilizando-se os marcadores da resposta inflamatória e angiogênese NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF neste trabalho. Diante do exposto, até onde sabemos, nenhum estudo na literatura foi realizado para avaliar a atividade de macrófagos e neutrófilos em amostras de sangue menstrual das pacientes portadoras e não portadoras de endometriose.

Após extensa revisão da literatura, foram identificados dois estudos comparando os níveis de VEGF-A em amostras de sangue menstrual de mulheres portadoras e não portadoras de endometriose (Print, Valtola *et al.*, 2004; Malik, Day *et al.*, 2006). Que se tenha notícia, até o momento, nenhum estudo comparando os níveis de TNF- $\alpha$ , VEGF, NAG ou MPO em amostras de sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras e não portadoras da doença foi encontrado.

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima restrita aos grânulos azurófilos de neutrófilos e tem sido amplamente usada para medir o acúmulo de neutrófilos em amostras teciduais. Por sua vez, a enzima N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG), presente nos lisossomas, tem sido empregada para detectar o acúmulo/atividade de macrófagos em uma grande variedade de amostras de tecido humano e animal (Xavier, Amaral *et al.*, 2010; Lopes E Lages, Belo *et al.*, 2011; Lamaita, Pontes *et al.*, 2012). NAG e MPO foram usadas neste estudo como meio para avaliação da presença/atividade de macrófagos e polimorfonucleares em amostras de sangue menstrual e periférico.

A presença de VEGF e TNF- $\alpha$  foi avaliada nessas amostras pela metodologia ELISA (Duoset® - R&D systems), utilizada conforme protocolo do fabricante. Esse método é de fácil aplicabilidade e amplamente usado em vários estudos para detecção de citocinas em amostras de tecido humano (Malik, Day *et al.*, 2006).

No presente estudo nenhuma diferença significativa comparando a idade, IMC e periodicidade do ciclo menstrual foi encontrada entre os grupos, caso e controle, o que sugere uma homogeneidade entre eles.

Os critérios de inclusão e exclusão deste trabalho foram bastante rígidos, procurando diminuir ao máximo os fatores de confusão que poderiam interferir nos resultados. A fase do ciclo menstrual não interferiu, todas as pacientes estavam na fase menstrual do ciclo. Nenhuma paciente estava em uso de medicação hormonal ou anti-inflamatório. Todos os casos e controles tiveram seus diagnósticos de endometriose confirmados ou excluídos por cirurgia. Por outro lado, uma limitação foi o pequeno número amostral, dificultado pelas peculiaridades necessárias para

inclusão das pacientes nos grupos caso e controle, assim como a coleta do material, sangue menstrual, uma vez que as pacientes teriam que voltar ao hospital no período menstrual. A própria heterogeneidade da doença (estádios diferentes) é também um fator que dificulta a interpretação dos resultados. Entretanto, nesse estudo, devido ao pequeno número de pacientes, não foi possível estratificação por estadiamento.

Evidências têm mostrado que pacientes com endometriose apresentam uma concentração aumentada e maior atividade de macrófagos e PMN no peritônio e no endométrio (Oral, Olive *et al.*, 1996; Hornung, Ryan *et al.*, 1997; Siristatidis, Nissotakis *et al.*, 2006). Além disso, também mostraram que os estrogênios modificam a atividade de macrófagos e PMN durante o ciclo menstrual normal e influenciam negativamente a resposta inflamatória (Garzetti, Ciavattini *et al.*, 1998; King e Critchley, 2010).

Outros trabalhos têm apontado que as citocinas produzidas por células inflamatórias são reguladas de modo diferente em pacientes portadoras de endometriose, sugerindo que uma fina modulação hormonal das citocinas ocorre em nível sistêmico e local, que poderia afetar a função ovariana e endometrial (Lamaita, Pontes *et al.*, 2012).

A endometriose é uma doença sistêmica estrógeno-dependente, portanto seria de grande importância estudar não somente a modulação local da resposta inflamatória, mas também a sistêmica e os possíveis mecanismos de interação recíproca (Burney e Giudice, 2012). Ressalta-se que os estrogênios são importantes reguladores da resposta imune, e, assim, sugere-se uma interação imuno-endócrina na progressão da endometriose (Garzetti, Ciavattini *et al.*, 1998). Dessa forma o atual estudo, procurou também avaliar a resposta inflamatória sérica e local e compará-las.

Algumas pesquisas avaliaram a presença de macrófagos no endométrio eutópico e os resultados foram controversos. Um trabalho mostrou redução na população de macrófagos durante a fase proliferativa precoce e sem diferença durante os estágios tardios do ciclo (Braun, Ding *et al.*, 2002). Outro evidenciou

aumento na população de macrófagos durante ambas fases, proliferativa e secretória do ciclo menstrual em pacientes com endometriose (Khan, Masuzaki *et al.*, 2004). Berbic *et. al.*, 2009, por outro lado, mostraram aumento significativo da população de macrófagos em toda fase proliferativa do ciclo em mulheres com endometriose. Evidenciaram ainda um aumento da densidade de macrófagos nas pacientes do grupo controle no meio da fase secretória do ciclo, enquanto que nas pacientes portadoras de endometriose foi observado um declínio da densidade de macrófagos ao longo do ciclo menstrual.

A partir destes estudos, observa-se que um enorme grau de heterogeneidade parece existir no componente macrofágico em microambientes específicos no endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose. Todavia, um fator limitante nas pesquisas é o não esclarecimento sobre o dia exato do ciclo menstrual em que foi colhida a amostra, o que pode interferir diretamente na contagem de macrófagos, assim como a constatação de que os diferentes estádios da doença apresentam grande influência nos resultados dos estudos. Além disso, os trabalhos geralmente avaliam grupos pequenos de pacientes devido aos rigorosos critérios necessários para um estudo satisfatório (Berbic, Schulke *et al.*, 2009).

Lamaita *et. al.*, 2012 encontraram aumento da atividade de NAG nas amostras de sangue periférico e fluido folicular das pacientes portadoras de endometriose comparadas ao controle, valendo ressaltar que todas essas pacientes estavam na primeira fase do ciclo menstrual. Outro estudo mostrou diminuição no índice quimiotático de neutrófilos em amostras de sangue periférico em pacientes portadoras de endometriose comparadas ao grupo controle, tendo-se observado também uma redução ainda maior naquelas pacientes com estádios mais avançados (III ou IV). As amostras também foram colhidas na primeira fase do ciclo menstrual (Garzetti, Ciavattini *et al.*, 1998).

Riley *et. al.*, 2007, avaliando a atividade de MPO no fluido peritoneal de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose não mostraram diferença entre os grupos, entretanto obtiveram menor atividade de MPO nas pacientes com estágio I da doença quando comparada ao grupo controle ou aos estádios

avançados III ou IV. Lamaita *et. al.*, 2012, avaliando os níveis de MPO em amostras de sangue periférico e fluido folicular de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose mostraram níveis mais baixos em amostras de fluido folicular e sem diferença entre as amostras de sangue periférico, sendo todas as amostras colhidas na primeira fase do ciclo menstrual.

A atividade de macrófagos nas amostras de sangue sérico e fluido menstrual foi avaliada nesta pesquisa pela medida da atividade de NAG, que não mostrou diferença estatística entre os grupos caso e controle, tanto nas amostras de sangue menstrual como sangue periférico. Todavia foi detectada uma maior atividade de NAG nas amostras de sangue menstrual das pacientes portadoras de endometriose ( $p = 0,0391$ ) o que não foi observado nos controles, um valor  $p = 0,0781$ . Estes resultados mostram uma maior atividade macrofágica nas amostras de sangue menstrual das mulheres portadoras de endometriose, corroborando a importância dos macrófagos no desenvolvimento das lesões endometrióticas já identificados em estudos *in vitro* (Liu *et al.*, 2006; Capobianco, Roveri-Querini, 2013).

A extensão da atividade de neutrófilos nas amostras de sangue sérico e fluido menstrual foi avaliada pela medida da atividade de MPO, que não mostrou diferença estatística entre os grupos, caso e controle, tanto nas amostras de sangue menstrual quanto nas de sangue periférico. Entretanto foi observada uma maior atividade desta enzima (MPO) em amostras de sangue menstrual quando comparado às amostras de sangue periférico nas pacientes portadoras de endometriose. O estudo mostrou uma atividade significativamente maior de neutrófilos, no fluido menstrual de pacientes portadoras de endometriose comparada ao sangue periférico ( $p = 0,0117$ ), sugerindo uma maior atividade inflamatória local neste grupo.

A mieloperoxidase mostrou uma correlação linear positiva com a N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase nas amostras de sangue periférico ( $p = 0,07$  e  $r = 0,641$ ) e nas amostras de sangue menstrual ( $p = 0,013$  e  $r = 0,441$ ) mostrando que a atividade de macrófagos e neutrófilos em sangue menstrual e periférico provavelmente estão associadas. Aparentemente, os macrófagos e neutrófilos seriam recrutados e

ativados o que resultaria na produção de VEGF e angiogênese no implante endometriótico, passo fundamental para o estabelecimento da doença (Liu et. al., 2006).

Os resultados deste trabalho não podem ser comparados aos estudos descritos previamente, uma vez que esses últimos não compararam pacientes na fase menstrual do ciclo. A análise de NAG e MPO em amostras de sangue menstrual é inédita na literatura, até onde sabemos e não mostrou diferença quando comparado pacientes doentes e seus controles, para sangue menstrual e periférico. Todavia, esta análise mostrou uma maior atividade inflamatória local evidenciada neste trabalho pela maior atividade de macrófagos e neutrófilos nas pacientes portadoras de endometriose.

Os macrófagos e polimorfonucleares desempenham um papel central na manutenção da atividade humoral e celular e parecem estar comprometidos na endometriose (Berkkanoglu e Arici, 2003; Tariverdian, Theoharides *et al.*, 2007). Essas células estão envolvidas em múltiplas funções, tais como secretar citocinas, interleucinas, interferons, fator de necrose tumoral, fatores estimuladores de colônia, fatores de crescimento e outros. Produtos secretados por monócitos/macrófagos podem positivamente ou negativamente modular a atividade de outras células imunes e os PMN e monócitos/macrófagos podem desempenhar um papel no reconhecimento de células alteradas (Garzetti, Ciavattini *et al.*, 1998). Os resultados aqui apresentados também sugerem um comprometimento da resposta imune celular, neste caso foi identificado uma hiperatividade em nível local das pacientes portadoras de endometriose, revelado pela maior atividade de NAG e MPO no sangue menstrual destas mulheres.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida por macrófagos ativados, que direta ou indiretamente promove a proliferação e adesão de células endometriais e angiogênese, observada na endometriose (Burney e Giudice, 2012). É também uma potente citocina pro-apoptótica produzida pelo endométrio humano normal. Várias pesquisas têm demonstrado concentrações mais altas do TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal de pacientes portadoras de endometriose em comparação aos controles, com níveis

ainda mais elevados em pacientes nos estádios mais avançados da doença, mostrando uma correlação desta citocina com a fisiopatologia da endometriose (Bullimore, 2003; Kharfi, Labelle *et al.*, 2003).

Até onde sabemos, nenhum outro estudo avaliou a presença do TNF- $\alpha$  em amostras de sangue menstrual em pacientes portadoras e não portadoras de endometriose, nem analisou atividade local (sangue menstrual) e em sangue periférico. A literatura é bastante controversa com relação aos achados dos níveis de TNF- $\alpha$ , se estão aumentados ou diminuídos quando avaliados no endométrio ou no sangue periférico.

Chae *et al.*, 2008, avaliando pacientes portadoras e não portadoras de endometriose em amostras de sangue periférico não mostraram diferença significativa entre os grupos, entretanto o nível sérico de TNFR1 e TNFR2, reguladores da função de TNF- $\alpha$ , foram significativamente mais altos em portadoras de endometriose. Concluindo - se que, em termos funcionais, provavelmente há uma menor atividade do TNF- $\alpha$ . As amostras de sangue para avaliação da presença de TNF- $\alpha$  nesse estudo foram colhidas na primeira fase do ciclo menstrual (Chae, Kim *et al.*, 2008).

Outros autores evidenciaram níveis em sangue periférico mais altos de TNF- $\alpha$  em pacientes portadoras de endometriose que nos controles (Bedaiwy, Falcone *et al.*, 2002; Seeber, Sammel *et al.*, 2008). Por outro lado outros autores identificaram níveis de TNF- $\alpha$  diminuídos em pacientes portadoras de endometriose em amostras de sangue periférico (Mihalyi, Gevaert *et al.*, 2010).

Os níveis do receptor TNF-RII foram avaliados por imunohistoquímica em amostras de endométrio nas fases proliferativa e secretória do ciclo menstrual de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose. Os resultados mostraram níveis significativamente mais baixos nos casos, com níveis ainda mais baixos nos estádios iniciais da doença. Quando estratificado para a fase do ciclo menstrual, os níveis foram significativamente menores na fase secretória do ciclo.

O mesmo trabalho avaliou a expressão do RNAm do receptor TNF-RII, mostrando níveis mais baixos nas pacientes portadoras de endometriose. Quando

estratificada por estágio, houve uma diminuição nos estágios iniciais comparados ao grupo controle, não sendo estes achados confirmados nos estágios III ou IV. Por outro lado, quando estratificado para a fase do ciclo menstrual não houve diferença quando comparadas as fase secretória e proliferativa entre casos e controles (Kharfi, Labelle *et al.*, 2003). Kyama *et. al.*, 2006, avaliando a expressão endometrial e peritoneal de RNAm de TNF- $\alpha$  no período menstrual identificaram níveis mais altos em pacientes portadoras de endometriose comparadas ao grupo controle.

Este estudo não evidenciou diferença significativa comparando as amostras de sangue menstrual e periférico entre pacientes portadoras de endometriose e seus controles para o TNF- $\alpha$ , assim como não demonstrou diferença significativa do comportamento local e sistêmico entre as pacientes com a doença e seus controles.

A dosagem desta citocina em amostras de sangue menstrual, até onde sabemos é inédita na literatura. Entre os estudos previamente descritos analisando o TNF- $\alpha$  em amostras de sangue periférico, as pacientes não estavam na fase menstrual do ciclo, logo não poderiam ser comparados com os resultados deste trabalho.

Os resultados apresentados neste trabalho não mostrou relação dos níveis de TNF- $\alpha$  com a endometriose, entretanto nossa amostra foi muito pequena para uma conclusão satisfatória do real papel desta citocina.

Comparado a mulheres saudáveis, pacientes com endometriose apresentam um endométrio com maior potencial para implantar-se e desenvolver-se fora da cavidade uterina. A formação de novos vasos capilares é provavelmente necessária para o crescimento do implante em mais que 2-3 mm, sugerindo um mecanismo dependente de angiogênese na endometriose (Groothuis, Nap *et al.*, 2005; Laschke e Menger, 2007).

O TNF- $\alpha$  e o VEGF, são importantes fatores angiogênicos. O VEGF, como um importante fator de crescimento heparina-ligante, com importantes propriedades mitogênica, morfogênica e quimioatática para células endoteliais, está aumentado no fluido peritoneal e no endométrio de pacientes com endometriose, provavelmente

refletindo um papel crítico na patogênese da doença (Xavier, Belo *et al.*, 2006; Laschke, Giebels *et al.*, 2011; Burney e Giudice, 2012).

Várias pesquisas têm focado em identificar a ligação entre endometriose e fatores pro-angiogênicos no sangue periférico, fluido peritoneal ou útero, principalmente o VEGF, que tem sido usado como um biomarcador. Após extensa revisão da literatura, dois estudos avaliando a presença do VEGFA em amostras de sangue menstrual em pacientes portadoras de endometriose e seus controles foram encontrados. Os resultados todavia, não mostraram diferença entre os grupos. (Print, Valtola *et al.*, 2004; Malik, Day *et al.*, 2006). Nenhum estudo, dentro do que se tem conhecimento, comparando amostras de sangue menstrual e periférico, foi encontrado na literatura.

Kyama *et al.*, 2006, avaliando a expressão de RNAm VEGF no peritônio e endométrio de pacientes portadoras de endometriose e controles no período menstrual não mostraram diferença entre os grupos. Todavia, outro trabalho que avaliou o índice proliferativo de células endoteliais entre pacientes portadoras e não portadoras de endometriose evidenciou maior índice naquelas com a doença. Quando estratificado para fase do ciclo menstrual este índice foi maior nos casos na fase proliferativa do ciclo. Entretanto, neste trabalho, não foi possível avaliar a fase menstrual devido ao número insuficiente de pacientes nesse estudo (Healy, Rogers *et al.*, 1998).

Xavier *et al.*, 2006, avaliando a presença de VEGF em amostras de sangue periférico mostraram maiores níveis do mesmo na fase secretória precoce e tardia do ciclo nos casos. A presença de VEGFA RNAm em amostras de sangue periférico na fase folicular do ciclo foi avaliada por Kyama *et al.*, 2006, sendo que não encontraram diferenças entre portadoras e não portadoras de endometriose. Diante destas diferentes conclusões, verifica-se que os resultados são controversos e mais estudos são necessários para avaliar adequadamente a importância deste marcador na patogênese da endometriose.

O presente estudo no que diz respeito à análise do VEGF, não demonstrou diferença significativa quando comparou as amostras de sangue menstrual das

pacientes portadoras e não portadoras de endometriose, da mesma forma para o sangue periférico. Não houve diferença significativa, tanto nos casos, como nos controles, quando se comparou a concentração local em sangue periférico do VEGF.

Entretanto observou-se uma maior concentração de VEGF nos casos, para as amostras de sangue periférico, embora com valor não significativo ( $p = 0,0932$ ).

Conforme exposto anteriormente, outros dois trabalhos avaliaram o VEGFA em amostras de sangue menstrual de pacientes portadoras de endometriose e seus controles, cujos resultados não mostraram diferença entre os grupos, sugerindo que o VEGFA não seria um fator local importante na fisiopatologia da doença. Nossos achados corroboram com os achados prévios.

Os sintomas de dor pélvica, dispareunia, dismenorreia, infertilidade prejudicam muito a qualidade de vida das pacientes portadoras da doença (Scholl, Bersinger *et al.*, 2009). A dor de origem inflamatória ocorre em resposta à injúria tecidual e como resultado de um processo inflamatório e muitos estudos têm evidenciado a endometriose em um contexto de um processo inflamatório crônico, sendo assim os sintomas de dor, infertilidade, podem ser decorrentes desse processo inflamatório (Howard, 2009). Muitas citocinas e marcadores da resposta inflamatória presentes no fluido peritoneal de pacientes com endometriose têm sido estudados, mas a maioria destes trabalhos não correlaciona a concentração dessas citocinas com os sintomas (Scholl, Bersinger *et al.*, 2009).

BEDAIWY *et. al.* 2006 mostraram níveis mais altos de leptina, uma proteína derivada de adipócito e que promove angiogênese, nas pacientes portadoras de endometriose comparadas ao grupo controle e seus níveis correlacionavam positivamente com as pacientes com dor pélvica (Bedaiwy, Falcone *et al.*, 2006). Um trabalho avaliando as citocinas TNF- $\alpha$ , PDGF, IL-6, IL-4 e TNF- $\beta$  no fluido peritoneal não mostrou qualquer associação entre os níveis dessas citocinas e os sintomas de dor (Overton, Fernandez-Shaw *et al.*, 1996). SCHOLL *et. al.* 2009, mostraram níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  e de glicodelina derivada do endométrio (PP14) nas pacientes com dor pélvica. O atual estudo não demonstrou diferença significativa entre os grupos com sintomas e assintomáticas para os níveis dos marcadores

NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF, nas amostras de sangue periférico ou menstrual, logo, não mostrou diferença na atividade inflamatória e de angiogênese para esses marcadores com relação à sintomatologia.

Este foi um estudo pequeno, com uma limitação amostral, para um teste com poder estatístico de 80% e um nível de significância de 5%. O cálculo amostral para este estudo mostrou a necessidade de pelo menos quinze pacientes em cada grupo, quando comparando amostras pareadas, para se detectar uma diferença estatística significativa entre os grupos, e para amostras não pareadas o ideal seria pelo menos 30 pacientes em cada grupo para demonstrar uma diferença significativa. Talvez, com um número maior de pacientes, poderíamos encontrar uma maior atividade angiogênica nos casos e uma melhor definição do papel do TNF- $\alpha$  na fisiopatologia da doença.

O sangue menstrual neste trabalho mostrou-se um fluido importante a ser estudado. É uma amostra de fácil obtenção por métodos não invasivos e que possui células endometriais e inflamatórias que fazem parte do processo fisiopatológico da endometriose.

O estudo desse fluido biológico, ainda pouco explorado, pode representar um relevante instrumento para melhor compreensão da fisiopatologia da doença. Sendo assim, tornar-se futuramente uma possibilidade como método diagnóstico não invasivo para a detecção precoce da endometriose

É possível sugerir, com base na literatura apresentada e algumas observações dos resultados aqui apresentados, que existe uma contribuição local do ambiente endometrial na fisiopatologia da doença. Por outro lado um provável ambiente permissivo para implantação do tecido endometrial parece também contribuir para o processo, atuando de forma coadjuvante para o desenvolvimento e progressão da doença.

Na fisiopatologia da endometriose tem sido proposto que uma “vigilância imunológica” inadequada poderia promover a aderência, persistência e progressão do tecido endometrial ectópico. Células apoptóticas são removidas por fagócitos, monócitos/macrófagos ou PMN e uma função fagocítica deficiente poderia contribuir

para o desenvolvimento da doença (Riley, Moen *et al.*, 2007). Uma maior atividade inflamatória local (endometrial), com maior capacidade de sobrevivência das células endometriais, associada a uma “vigilância imunológica” inadequada tanto no peritônio ou mesmo sistêmica, poderia ser um mecanismo permissivo para o tecido endometrial “escapar” da “vigilância imunológica” e com suas potenciais características, persistir, implantar e desenvolver no peritônio, contribuindo para o estabelecimento da endometriose.

Neste estudo o MPO e o NAG mostraram-se significativamente mais ativos no sangue menstrual de pacientes com endometriose, e que existe uma correlação positiva entre NAG e MPO em sangue periférico e NAG e MPO menstrual, o que reforça a importância desses fatores inflamatórios na fisiopatologia da doença.

Os níveis de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF, nas amostras de sangue menstrual e periférico entre pacientes com dor pélvica, infertilidade e dispareunia e assintomáticas não mostraram diferença entre os grupos.

Entretanto faz-se necessário novos estudos, com um número amostral maior, e idealmente que as pacientes sejam estratificadas por estágio da doença, para melhor compreensão da fisiopatologia da endometriose, assim como a compreensão do verdadeiro papel destes marcadores da resposta inflamatória e angiogênica.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

1 A atividade de NAG e MPO assim como as dosagens de VEGF e TNF-  $\alpha$  nas amostras de sangue periférico não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados;

2 A atividade de NAG e MPO assim como as dosagens de VEGF e TNF-  $\alpha$  nas amostras de sangue menstrual não mostraram diferenças significativas entre os grupos estudados;

3 A atividade NAG e MPO no sangue menstrual do grupo de mulheres com endometriose foi significativamente maior que no sangue periférico;

4 Observou-se uma correlação positiva entre o NAG e MPO no sangue periférico e menstrual;

5 A presença de sintomas não mostrou uma associação com a atividade inflamatória local nem com a sérica.

## REFERÊNCIAS

BALDI, A.; CAMPIONI, M.; SIGNORILE, P. G. Endometriosis: pathogenesis, diagnosis, therapy and association with cancer (review). Athens: **Oncol Rep.**19 (4) : 843-6 p. Apr 2008.

BEDAIWY, M.; FALCONE, T. Laboratory testing for endometriosis. Amsterdam: **Clinica Chimica Acta.** 340: 41-56 p. 2004.

BEDAIWY, M. et al. Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients. Oxford: **Human Reproduction.** 21: 788-791 p. 2006.

BEDAIWY, M. A. et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. Oxford: **Human Reproduction.** 17: 426-431 p. 2002.

BERBIC, M. et al. Macrophage expression in endometrium of Women with and without endometriosis. Oxford: **Human Reproduction.** 24: 325-332 p. 2009.

BERKKANOGLU, M.; ARICI, A. Immunology and endometriosis. New York: **American Journal of Reproductive Immunology,** 50: 48-59 p., 2003.

BRAUN, D. et al. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. New York: **Fertility and Sterility.** 78: 830-835 p. 2002.

BRANDELLI, A.; PASSOS, E. Glycosidases in the Peritoneal Fluid from Infertile Women With and Without Endometriosis. Toronto: **Clinical Biochemistry,** 31 (3): 181-186 p. 1998.

BULLIMORE, D. W. Endometriosis is sustained by tumor necrosis factor- $\alpha$ . Edinburgh: **Medical Hypotheses.** 60: 84-88 p. 2003.

BULUN, S. E. Mechanisms of Endometriosis. Boston: **The New England Journal of Medicine**. 360: 268-279 p. 2009.

BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. New York: **Fertility and Sterility**. 98: 511-519 p. 2012.

CAPOBIANCO, A; ROVERE-QUERINI, P. Endometriosis, a disease of the macrophage. Switzerland: **Frontiers in Immunology**.4: 1-14 p. Jan 2013.

CARLOS, P. et al. Nuclear factor kB pathway and interleukin-6 are affected in eutopic endometrium of women with endometriosis. London: **Reproduction Research**. 137: 727-737 p. 2009.

CHAE, S. J. et al. Tumor Necrosis Factor (TNF) -TNF Receptor Gene Polymorphisms and Their Serum Levels in Korean Women with Endometriosis. New York: **American Journal of Reproductive Immunology**. 60: 432-439 p. 2008.

CHEGINI, N.; DOU, Q.; WILLIAMS, R. An iverse relation between the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF -alpha) and TNF-alpha receptor in human endometrium. **New York: American Journal of Rproduction Immunology**. 42: 297-302 p. 1999.

CRITCHLEY, H. et al. The endocrinology of menstruation - a role for the immune system. Oxford: **Clinical Endocrinology**. 55: 701-710 p. 2001.

DEBROCK, S. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  , interleucina-6 and interleucina-8 do not promote adhesion of human endometrial epithelial cells to mesothelial cells in a quantitative *in vitro* model. Oxford: **Human Reproduction**. 21: 605-609 p. 2006.

DMOWSKI, W. P.; BRAUN, D. P. Immunology of endometriosis. New York: **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. 18: 245-263 p. 2004.

DONNEZ, J. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Oxford: **Human Reproduction**. 13: 1686-1690 p. 1998.

GARZETTI, G. G. et al. Decrease in Peripheral Blood Polymorphonuclear leukocyte Chemotactic Index in Endometriosis: Role of Prostaglandin E2 Release. New York: **Obstetric & Gynecology**. 91: 25-29 p. 1998.

GIRLING, J.; ROGERS, P. Recent advances in endometrial angiogenesis research. London: **Angiogenesis**. 8: 89-99 p. 2005.

GIUDICE, L.; KAO, L. Endometriosis. London: **Lancet**. 364: 1789-1799 p. 2004.

GLEICHER, N; DMOWSKI, W. P. et al. Lymphocyte subsets in endometriosis. New York: **Obstetric & Gynecology**. 63: 463-466 p.1984.

GROOTHUIS, P. et al. Vascular development in endometriosis. London: **Angiogenesis**. 8: 147-156 p. 2005.

HALME, J.; HAMMOND, M.; HULKA, J. E. A. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. New York: **Obstetric & Gynecology**. 64: 151-154 p. 1984.

HEALY, D. L. et al. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. Oxford: **Human Reproduction Update**. 4: 736-740 p. 1998.

HEY-CUNNINGHAM, A. et al. Endometrial Stromal Cells and Immune Cell Populations Within Lymph Nodes in a Nonhuman Primate Model of Endometriosis. Thousand Oaks: **Reproductive Sciences**. 18: 747-754 p. 2011.

HILARY, C. et al. The endocrinology of menstruation - a role for the immune system. Oxford: **Clinical Endocrinology**. 55: 701-710 p. 2001.

HILL, J.A.; RARIS, H.M. et al. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. New York: **Fertility and Sterility**. 50: 216-222 p. 1988.

- MICHALOSKI, J.S.; REDONDO, A.R.; et al. Discovery of pan VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. *Science Advances Significant RESEARCH, Global Impact* . 2(10).2016
- HO, H. N.; WU, M. Y.; YANG, Y. S. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. New York: **American Journal of Reproductive Immunology**. 167: 257-261 p. 1997.
- HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric Statistical Methods**: New York: John Wiley & Sons 1999.
- HORNUNG, D. et al. Immunolocalization and Regulation of the Chemokine RANTES in Human Endometrial and Endometriosis Tissues and Cells. New York: **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 82: 1621-1628 p. 1997.
- HOWARD, F. Endometriosis and Mechanisms of Pelvic Pain. Philadelphia: **Journal of minimally invasive gynecology**. 16: 540-550 p. 2009.
- HSIEH, Y. Y. et al. Glutathione S-transferase M1\*null genotype but not myeloperoxidase promoter G-463A polymorphism is associated with higher susceptibility to endometriosis. In: (Ed.). **Mol Hum Reprod**. England, v.10, 2004. p.713-7.
- ININNS, E. K.; GATANAGA, M.; CAPPUCCINI, F. E. A. Growth of the endometrial adenocarcinoma cell line AN3 CA is modulated by tumor necrosis factor and its receptor is up-regulated by estrogen in vitro. Baltimore: **Endocrinology**. 130: 1852-1856 p. 1992.
- IVAN, R.; ARTHUR, R. **Imunobiologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA: 1-20 p. 2011.
- KANZAKI, H. et al. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. St.Louis: **American Journal of Obstetric and Gynecology**. 167: 257-261 p. 1992.

- KELLY, R.; KUNG, A.; CRITCHLEY, H. Cytokine control in human endometrium. Cambridge, UK: **Reproduction**. 121(1): 3-19 p. 2001.
- KENNEDY, S. et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Oxford: **Human Reproduction**. 20: 2698-2704 p. 2005.
- KHAN, K. et al. Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum. New York: **Fertility and Sterility**. 81: 652-661 p. 2004.
- KHAN, K. N. et al. *Escherichia coli* contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. New York: **Fertility and Sterility**. 94: 2860-2863 p. 2010.
- KHARFI, A. et al. Deficient expression of tumor necrosis factor receptor type 2 in the endometrium of women with endometriosis. New York: **American Journal of Reproductive Immunology**. 50: 33-40 p. 2003.
- KING, A.; CRITCHLEY, H. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory process in the human endometrium. Oxford: **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 120: 116-126 p. 2010.
- KOKORINE, I. et al. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesion. New York: **Fertility and Sterility**. 68: 246-251 p. 1997.
- KYAMA, C. et al. Potencial involvement of immune system in the development of endometrosis. London: **Reproductive Biology and Endocrinology**. 1: 1-9 p. 2003.
- KYAMA, C. M. et al. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. New York: **Fertility and Sterility**. 85: 1667-1675 p. 2006.

LAMAITA, R. et al. Evaluation of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. Tokio: **Obstetrics and Gynaecology Research**. 38: 810-816 p. 2012.

LASCHKE, M.; MENGER, M. *In vitro* and *in vivo* approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. Oxford: **Human Reproduction Update**: 1-12 p. 2007.

LASCHKE, M. W. et al. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. Oxford: **Human Reproduction**. 21: 262-268 p. 2006.

LEBOVIC, D.; MUELLER, M. D.; TAYLOR, R. N. Immunobiology of endometriosis. New York: **Fertility and Sterility**. 75: 1-10 p. 2001.

LEBOVIC, D. I. et al. Immunology of endometriosis. Philadelphia: **Immunology and Allergy Clinics of North America**. 22: 585-598 p. 2002.

LEYENDECKER, G. et al. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. Oxford: **Human Reproduction Update**. 4: 752-762 p. 1998.

LEYENDECKER, G.; WILDT, L.; MALL, G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. Munchen: **Arch Gynecol Obstet**. 280 (4): 529-38 p. Oct 2009.

LIN, Y.; LAI, M. et al. Neutrophils and Macrophages Promote Angiogenesis in the Early Stage of Endometriosis in a Mouse Model. Baltimore: **Endocrinology**. 147 (3): 1278-1286 p. 2006.

LOPES E LAGES, E. et al. Analysis of Systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. Paris: **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 65: 496-499 p. 2011.

MABROUK, M. et al. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. Munchen: **Arch Gynecol Obstet**. 285: 1307-13012 p. 2012.

MACHADO, D. E. et al. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. Roma: **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. 29: 1-9 p. 2010.

MALIK, S. et al. Menstrual effluent in endometriosis shows no difference in volume, VEGF-A, MMP2 and MMP9 or sFLT. London: **Reprod Biomed Online**. 12 (2): 174-81p. Feb 2006.

MARTIN, P. Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. New York: **Science**. 276: 75-81 p. 1997.

MATHUR, S. et al. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. Oxford: **Clinic expert Immunology**. 50: 259-266 p. 1982.

MAY, K. E. et al. Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. Oxford: **Human Reproduction Update**. 17: 637-653 p. 2011.

MAYBIN, J.; CRITCHLEY, H.; JABBOUR, H. Inflammatory pathways in endometrial disorders. Limerick: **Molecular and Cellular Endocrinology**. 335: 42-51 p. 2011.

MIHALYI, A. et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. Oxford: **Human Reproduction**. 25: 654-664 p. 2010.

MORSCH, D. M. et al. C-fos gene and protein expression in pelvic endometriosis: a local marker of estrogen action. Dordrecht: **Journal of Molecular Histology**. 40: 53-58 p. 2009.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. Porto alegre: Artmed: 1-40 p. 2010.

OOSTERLYNCK, D. et al. Women with endometriosis show a defect in natural Killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. New York: **Fertility and Sterility**. 56: 45-51 p. 1991.

OOSTERLYNCK, D. J. et al. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. New York: **Obstetric and Gynecology**. 82: 206-212 p. 1993.

ORAL, E.; OLIVE, D.; ARICI, A. The peritoneal environment in endometriosis. Oxford: **Human Reproduction Update**. 2: 385-398 p. 1996.

OVERTON, C. et al. Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain. Oxford: **Human Reproduction**. 11: 380-386 p. 1996.

PODGAEC, S. et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. Oxford : **Human Reproduction**. 22: 1373-1379 p. 2007.

PRINT, C. et al. Soluble factors from human endometrium promote angiogenesis and regulate the endothelial cell transcriptome. Oxford: **Human Reproduction**. 19: 2356-2366 p. 2004.

REIS, F. et al. Activin A and Follistatin in Menstrual Blood: Low Concentrations in Women With Dysfunctional Uterine Bleeding. Thousand Oaks: **Reproductive Sciences**. 14: 383-389 p. 2007.

RILEY, C. F.; MOEN, M. H.; VIDEM, V. Inflammatory markers in endometriosis: reduced peritoneal neutrophil response in minimal endometriosis. Copenhagen: **Acta Obstetrica et Gynecologica**. 86: 877-881 p. 2007.

ROGERS, P. et al. Endometrial Angiogenesis, Vascular Maturation, and Lymphangiogenesis. Thousand Oaks: **Reproductive Sciences**. 16: 147-151 p. 2009.

ROITT, I.; RABSON, A. **Imunobiologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 95-104 p. 2011.

SALAMONSEN, L.; LATHBURY, L. J. Endometrial Leukocytes and menstruation. Oxford: **Human Reproduction Update**. 6: 16-27 p. 2000.

SAMPSON, J. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. Philadelphia: **The American Journal of Pathology cellular and Molecular Biology of Disease**. 3: 93-110 p. 1927.

SASSON, I.; TAYLOR, H. Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. New York: **Annals of New York Academy of Sciences**. 1127: 106-115 p. 2008.

SCHOLL, B. et al. Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis. Carnforth: **Gynecological Endocrinology**. 25: 701-706 p. 2009.

SEEBER, B. et al. Panel of markers can accurately predict endometriosis in a subset of patients. New York: **Fertility and Sterility**. 89: 1073-1081 p. 2008.

SERDAR E. BULUN, M. D. Mechanisms of Disease Endometriosis. Boston: **The New England Journal of Medicine**. 360: 268-79 p. 2009.

SHARPE-TIMMS; KL. Endometrial Anomalies in Women with Endometriosis. New York: **Annals New York Academy of Sciences**. 955: 131-147 p. 2002.

SIDELL, N.; WAI HAN, S.; SAMPATH, P. Regulation and Modulation of Abnormal Immune Responses in Endometriosis. New York: **Annals New York Academy of Sciences**. 955: 159-173 p. 2002.

SIRISTATIDIS, C. et al. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. Tokio: **Journal of Obstetric and Gynaecology**. 32: 162-170 p. 2006.

SUGINO, N. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. In: (Ed.). **Placenta**. England, v.28 Suppl A, S133-136 p. 2007.

TABIBZADEH, S. et al. Site and menstrual cycle-dependent expression of proteins of the tumour necrosis factor (TNF) receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase-specific production of TNF alpha in human endometrium. Oxford: **Human Reproduction**. 10: 277-286 p. 1995.

TAKAHASHI, K. et al. Clinical usefulness of CA-125 levels in the menstrual discharge in patients with endometriosis. New York: **Fertility and Sterility**. 54: 360-362 p. 1990. Menstrual CA125 as a marker for patients with endometriosis: A preliminary report. New York: **Fertility and Sterility**. 33: 585-588 p. 1998

TARIVERDIAN, N. et al. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. Berlin: **Semin Immunopathol**. 29 (2): 193-210 p. Jun 2007. I

TAYLOR, R. N. et al. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. Thousand Oaks: **Reprod Sci**, v. 16, n. 2, p. 140-6, Feb 2009.

UEKI, M. Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. St.Louis: **American Journal of Obstetric and Gynecology**. 165: 201-209 p. 1991.

VINATIER, D.; DUFOUR, P.; OOSTERLYNCK, D. Immunological aspects of endometriosis. Oxford: **Human reproduction Update**. 2: 371-384 p. 1996.

VINATIER, D. et al. Theories of endometriosis. Amsterdam: **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 96: 21-34 p. 2001.

WANG, I. Y. et al. Endometrial lysosomal enzyme activity in normal cycling endometrium. Oxford: **Mol Hum Reprod**. 5, (1): 79-83 p. Jan 1999.

XAVIER, D. O. et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. France: **Biomed Pharmacother**. Elsevier SAS., 64: 220-225 p. 2010.

XAVIER, P. et al. Serum levels of VEGF and TNF- $\alpha$  and theirs association with C-reactive protein in patients with endometriosis. Munchen: **Arch Gynecol Obstet**. 273: 227-231 p. 2006.

ZELLER, J. M.; HENIG, I. et al. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. New York. **Am J Reprod Immunol microbiol.** 13: 78-82 p.1987



Exames invasivos para diagnóstico de endometriose, resultado de exames anátomo patológicos:-----

Exames não invasivos para diagnósticos de endometriose:-----

Método contraceptivo atual:-----

Historico Familiar endometriose:-----

HF:-----

Coleta sangue menstrual e periférico: data-----

Consentimento:-----

## APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa

Carta de Obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido para a Pesquisa: “Avaliação da presença de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF como possíveis marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras de endometriose “

Eu, Cláudia Maria da Silva ,médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais , CRM MG 38980, RG:MG-6833792, situada na Avenida Professor Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, CEP 30130-100 ,Belo Horizonte, cujo telefone para contato é- (31) 92410151, vou desenvolver um projeto de pesquisa cujo título é: “Avaliação da presença de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF como possíveis marcadores da resposta inflamatória em sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras de endometriose”

A endometriose acomete 10% da população feminina em idade fértil, podendo comprometer 40-70% da população feminina com dor pélvica e/ou infertilidade. Pesquisas avaliando o processo inflamatório em pacientes portadoras de endometriose podem contribuir muito para melhor compreensão da doença, diagnóstico e tratamento. O objetivo deste trabalho é avaliar a presença de marcadores da resposta inflamatória no sangue menstrual e sérico de pacientes portadoras e não portadoras de endometriose.

Estamos convidando a senhora a participar desta pesquisa que é voluntária e constará de perguntas que deverão ser respondidas através de questionário aplicado pelo médico assistente e da avaliação clínica (exame ginecológico) e laboratorial (coleta de sangue em veia antecubital direita, 2ml e coleta de sangue menstrual 1ml. Necessito que a senhora forneça informações a respeito de se histórico médico e ginecológico e de dados e exames contidos em seu prontuário médico. As perguntas relativas ao questionário estão em anexo, devendo ocupá-la por 20.minutos, para responder as questões. Na avaliação clínica serão realizados os seguintes procedimentos: Exame físico ginecológico dirigido com avaliação de peso, altura, ectoscopia geral, medida de pressão arterial (PA) com a paciente sentada, aferindo medida de PA em membro superior direito, avaliação de frequência cardíaca e de pulso, temperatura axilar. Exame de abdome com palpação abdominal. Avaliação ginecológica envolvendo ectoscopia da genitália externa, exame especular, coleta de exame de prevenção caso o mesmo não esteja atualizado, toque vaginal bimanual. Avaliação laboratorial: coleta de sangue periférico na veia antecubital direita (2ml) para envio ao laboratório e análise. Coleta de(1ml) de sangue menstrual obtido da cérvix uterina com seringa de 3ml após exame especular.

Esta avaliação não oferece riscos mas poderá ocasionar os seguintes desconfortos:

\* Dor no local da punção venosa, podendo ocasionalmente desenvolver hematomas/ecmose local (roxo no local da punção), ou infecção local.

\* Desconforto próprio do exame ginecológico com a passagem do espécuro. Sua participação não trará qualquer benefício direto, mas proporcionará um melhor conhecimento a respeito da doença (endometriose), que em futuros tratamentos os médicos poderão beneficiar outras pessoas ou, então, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Não existe outra forma de obter dados com relação ao procedimento em questão e que possa ser mais vantajoso. Informo que a senhora tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais, situado na Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campos Pampulha, CEP 31270901, Belo Horizonte-MG, fone/fax : (31) 3409-4592, e-mail [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br) e comunique-se com o Coordenador.

Também é garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Garanto que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum dos participantes.

A Senhora tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso seja solicitado, darei todas as informações que solicitar. Não existirão despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível sua identificação. Anexo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação da presença de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF como possíveis marcadores da resposta inflamatória em sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras de endometriose". Eu discuti com a Dra. Cláudia, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Assinatura do entrevistado-----

Nome:-----RG:-----

Endereço:-----Fone: (-----)

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Assinatura do(a) pesquisador(a)-----

APÊNCICE C - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais-COEP, parecer nº0661.0.203.000-11



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0661.0.203.000-11

**Interessado(a): Profa. Márcia Mendonça Carneiro**  
**Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 15 de junho de 2011, a alteração abaixo relacionada referente ao projeto de pesquisa intitulado "**Diagnóstico não-invasivo de endometriose: marcadores no sangue menstrual**":

- Inclusão da dosagem das moléculas IFN-gama, IL-10 (citocinas pró-inflamatórias) e MPO e NAG (proteínas também relacionadas com o processo inflamatório).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## APÊNDICE D - Soluções Usadas

- a) Solução Triton X-100 a 0,1% v/v em salina:  
 Triton X-100-----1,0 ml  
 Salina a 0.9% q.s.p.-----1000 ml
- b) Tampão Citrato/Fosfato a 0,039 M, pH4,5  
 Ácido Cítrico a 0,1 M -----300 ml  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 0,1 M -----465 ml
- c) Tampão Glicina a 0,2 M, pH10,6  
 Glicina a 0,8 M -----100 ml  
 NaCl a 0,8 M -----100 ml  
 NaOH a 0,8 M-----100 ml
- d) Solução Fosfato de sódio pH5,4  
 Solução  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (PM=358,14) a 0,32 M  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -----28,65g  
 $\text{H}_2\text{O}$ -----q.s.p.-----250 ml
- e) HTAB a 0,5% (0,5g em 100 ml) em TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO  
 HTAB -----0,05g-----0,10g-----0,20g  
 Tampão Fosfato de Sódio  
 80mM pH5,4-----10 ml-----20 ml-----40 ml
- f) Tampão de lavagem : 1,3 L/ placa  
 Tween 20 ( Polioxietilensorbitano monolaurato – Synth – cod T1.038) a 0,05  
 Tween 80→1 ml + 3 ml de água deionizada estéril= Tween 20  
 Tampão de Lavagem = Tween 20 (650 µl) + PBS ( 1,3 litros)
- g) Tampão de Bloqueio (300 µl/poço)  
 01 placa 96 poços → PBS estéril (40 ml) + BSA 1% (0,0400 g)  
 $1/2$  placa 48 poços → PBS estéril (20 ml) + BSA 1% (0,200 g)

h) Solução OPB (o-Phenylenediamine dihydrochloride for ELISA) – tabletes de 2 mg- usar recipiente âmbar

	placa→	$\frac{1}{2}$ placa
Tampão citrato/fosfato pH 5,0 -----	(10 ml)→	(5 ml)
OPD-----	(4 mg)→	(2 mg)
H2O2 (30v/v)-----	(2 µl)→	(µl)

i) Tampão citrato/fosfato pH 5,0

Ácido cítrico →9,6 g

Água deionizada q.s.p 500 ml

j) PBS pH 7,2-7,4	sol. de uso (g)	sol. estoque [10x] g
NaCl (PM=58,44) 137 mM	8,0 g	80,0 g
KCl ( PM=74,56 2,7 mM	0,2 g	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (PM=141,96) 8,1 mM ou	1,15g	11,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (PM=358,140) 8,1 Mm	2,9 g	29,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( PM=136,09) a 1,5 mM	0,21 g	2,1 g
Água deionizada q.s.p	100 ml	1000 ml



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

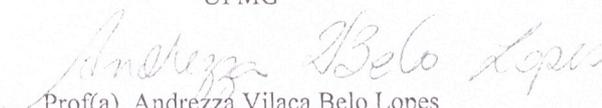
"Avaliação da presença de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF como possíveis marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras de endometriose"

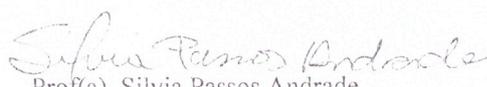
### CLAUDIA MARIA DA SILVA

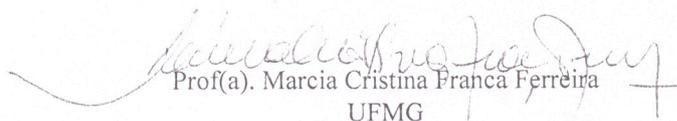
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

Aprovada em 21 de junho de 2013, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Marcia Mendonca Carneiro - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Andreza Vilaca Belo Lopes  
UFMG

  
Prof(a). Silvia Passos Andrade  
UFMG

  
Prof(a). Marcia Cristina Franca Ferreira  
UFMG

Belo Horizonte, 21 de junho de 2013.



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA CLAUDIA MARIA DA SILVA - 2011656146

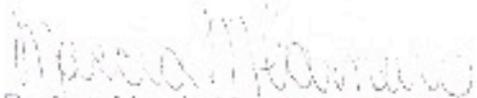
Realizou-se, no dia 21 de junho de 2013, às 09:00 horas, Sala 526 - 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada "Avaliação da presença de NAG, MPO, TNF- $\alpha$  e VEGF como possíveis marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em sangue periférico e menstrual de pacientes portadoras de endometriose", apresentada por CLAUDIA MARIA DA SILVA, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Marcia Mendonça Carneiro - Orientador (UFMG), Prof(a). Andrezza Vilaca Belo Lopes (UFMG), Prof(a). Sílvia Passos Andrade (UFMG), Prof(a). Márcia Cristina França Ferreira (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada  
 Aprovada condicionamente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa  
 Reprovada

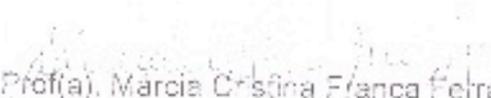
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

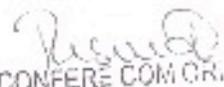
Belo Horizonte, 21 de junho de 2013.

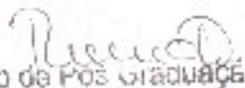
  
 Prof(a). Marcia Mendonça Carneiro  
 Doutora - UFMG

  
 Prof(a). Andrezza Vilaca Belo Lopes  
 Doutora - UFMG

  
 Prof(a). Sílvia Passos Andrade  
 Doutora - University of London

  
 Prof(a). Márcia Cristina França Ferreira  
 Doutora - UFMG

  
 CONFERE COM ORIGINAL  
 Centro de Pós-Graduação  
 Faculdade de Medicina - UFMG

  
 Centro de Pós-Graduação  
 Faculdade de Medicina-UFMG  
 Av. Prof. Alfredo Balena, 190- 5º Andar  
 CEP 30130-100-Funcionários - BHMG