GUILHERME BARRETO CAMPOS

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS *MOLLICUTES* E OUTROS
MICRORGANISMOS DE INTERESSE GENITAL NA
ENDOMETRIOSE HUMANA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2016

GUILHERME BARRETO CAMPOS

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS *MOLLICUTES* E OUTROS
MICRORGANISMOS DE INTERESSE GENITAL NA
ENDOMETRIOSE HUMANA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Coorientador:
Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

Versão corrigida. A versão original
eletrônica, encontra-se disponível no
ICB e na Biblioteca Digital de
Dissertações e Teses da USP

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de
Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Campos, Guilherme Barreto.

Avaliação da participação dos *Mollicutes* e outros microrganismo de interesse genital na endometriose humana / Guilherme Barreto Campos. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micoplasmas genitais.

Versão do título para o inglês: Participation of *Mollicutes* and genital interest microorganisms on human endometriosis

1. *Mollicutes* 2. *Mycoplasma hominis* 3. *M. genitalium* 4. Micoplasmas genitais 5. Infecção sexualmente transmissível 6. Endometriose I. Timenetsky, Prof. Dr. Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0118/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Guilherme Barreto Campos.

Título da Tese: Avaliação da participação dos *Mollicutes* e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana.

Orientador(a): Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de março de 2014.

PARECER 1170/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação da participação dos Mollicutes e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana* " do pesquisador JORGE TIMENETSKY e aluno GUILHERME BARRETO CAMPOS.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.02.2015**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedicatória

Aos meus pais, Eliane e Geraldo, por lutarem com todo amor e devoção, de forma incansável, para que este sonho se realizasse.

Aos meus irmãos Francisco e Leonardo por acompanharem de forma afetuosa e singular os passos desta caminhada.

A tod@s que emanaram o mais puro amor e energia positiva.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, vinculado ao processo nº 2014/12009-5, sem o qual este estudo não seria realizado.

AGRADECIMENTOS

A todos os cidadãos brasileiros, representados pelas agências de fomento FAPESP e CAPES, por me darem a oportunidade de me formar em uma universidade pública. Espero devolver à sociedade ótimos frutos deste longo investimento.

A todas as mulheres que participaram deste estudo, por compartilharem suas histórias de vida e por doarem material clínico para análise. Sem a participação de cada uma delas este trabalho não seria possível. Muito obrigado por contribuírem com este passo importante em minha vida e com a ciência brasileira.

Aos meus pais, Geraldo e Eliane, aos meus irmãos, Francisco e Leonardo, às minhas cunhadas Thaís e Otília e ao meu sobrinho Luís, por serem a representação do amor incondicional, essencial para que este trabalho fosse concluído.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Timenetsky, por me ensinar no dia a dia a admirar a pesquisa de forma pura e apaixonada e por me guiar nos passos mais marcantes da minha carreira acadêmica. Não esquecerei jamais das oportunidades e da convivência.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, por me inspirar a cada exemplo de vitória bravamente conquistada, por acreditar em mim a todo tempo e por me mostrar que posso ir além. Toda palavra seria pouca para demonstrar a minha gratidão.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Maurício S. Abrão, por ser exemplo de devoção ao cuidado com o ser humano, seja este paciente ou colega de trabalho; por acreditar que eu seria capaz de transformar uma ideia em algo concreto e por me proporcionar experiências pessoais e profissionais únicas.

A Aricelma França por ser: admirável, ética, competente, amiga, mãe, sorriso, ombro, exemplo de vida, singular e escorpião. Obrigado pelos 5 anos de atenção e cuidado! Amo-te, pequena!

À Família do Laboratório de Micoplasma da USP, oficiais ou não (Aline, Lucas, Verena, Ana Márcia, Maysa, Camila, Regis, Jorge, Izadora, Cristina, Aricelma, Driely, Patrícia e Natália), pela troca de conhecimento em cada reunião, pela ajuda em cada experimento, pela terapia em grupo nos cafés da tarde e por cada sorriso compartilhado nas fotos dos aniversários. Em especial, a Camila, Maysa e Izadora por serem parcerias fundamentais na lida da bancada e do PC.

A toda equipe profissional de saúde do Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e do Hospital Sírio-Libanês (São Paulo). Aos médicos: Maurício Abrão, Lídia Myung, Igor Padovesi, Rogério Gomes, Luís Flávio, Guilherme, Antônio Bassi, Sérgio Podgaec, Tatiana

Lourenção, Fernanda Okita, Tatiana Yamashiro, Cláudio, Luiza, Luciano Gibran, Daniel Caraça e Giuliano Borrelli. A todas instrumentadoras, em especial a Vivian Curcio e Karina. A todos da equipe de enfermagem durante as cirurgias. A todos os demais pesquisadores do grupo da endometriose, em especial a Marta Privato, Maria Lucia e Marici Rached. Todos foram atenciosos e essenciais para que a coleta das amostras ocorresse da melhor forma possível. O coordenado e organizado trabalho em equipe fez com que este estudo fosse possível e a caminhada menos árdua. Minha eterna gratidão a tod@s!

Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa por abrir as portas do Laboratório de Micotoxinas para que os experimentos de expressão gênica fossem realizados. A todos os alunos e funcionários do mesmo laboratório pela atenção, paciência e cuidado comigo durante o período dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen por abrir as portas do Laboratório de Imunobiologia de Transplante para a realização dos experimentos de dosagem de citocinas (Bioplex). Em especial, à Dra. Meire Hiyane pela atenção, paciência e profissionalismo ao me assistir nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Braga Jr. do IMS/CAT UFBA por toda ajuda e apoio nas análises estatísticas ao longo deste trabalho.

Ao colega de pós-graduação Alexy Orozco pela atenção, disposição e prestatividade nos experimentos de dosagem de proteínas. Obrigado por demonstrar em gestos que, para a ciência, não há fronteira de línguas, existe um coração latino!

A todos os docentes da USP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II, pela enorme prestatividade.

Às funcionárias Isabel, Naíde, Gisele e Caciara das secretarias do Departamento de Microbiologia pela atenção e paciência ao longo destes anos.

À família do Laboratório de Microbiologia do IMS/CAT UFBA pelo apoio de sempre. Em especial, ao Prof. Dr. Lucas por abrir as portas do laboratório para a realização dos experimentos e ao aluno Lucas Coelho pela imensurável ajuda nos experimentos de PCR.

Aos amigos de longa data (Lucas, Danilo, Simone, Daniel, Aline, Braga, Verena, Raquel e Tiago Oliveira) por serem tão marcantes na minha caminhada até aqui. A distância jamais apagará os laços fraternos que nos unem.

Aos amigos do “Grupo Show” pelos 15 anos de lealdade e carinho. Que os laços de estima e afeto se reforcem a cada ano!

À Família Marques, minha família paulistana, por me adotarem da forma mais bonita, por torcerem por mim e por vibrarem comigo ao longo desses anos. Muito obrigado por tudo!

Aos demais amigos e familiares não citados e que ao longo da minha vida ou dos últimos anos me desejaram toda força e sucesso. Muito obrigado!

A Deus e a todos os espíritos de luz que iluminam a minha caminhada.

A todos, aqui não mencionados, que de alguma forma viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Nostalgia - Vivendo do ócio
<http://miud.in/1HKL>

RESUMO

Campos, G. B. **Avaliação da participação dos *Mollicutes* e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana.** 2016. 172 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A endometriose (EDT) é uma doença sem etiopatogênese definida caracterizada pela presença de endométrio fora do útero. A teoria da menstruação retrógrada justifica a maior parte das ocorrências da enfermidade. Baseado nesta teoria, o presente estudo avaliou a presença de *Mollicutes* (*Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *U. parvum*), Papilomavírus humano (HPV) e *Neisseria gonorrhoeae*. As amostras analisadas foram: swab endocervical, fluido peritoneal e biópsia de lesão de endometriose de mulheres com endometriose (grupo caso ou EDT) e de biópsia de peritônio pélvico sadio de mulheres sem endometriose (grupo controle). Além disso, avaliou-se a associação entre a detecção dos agentes infecciosos mencionados com o perfil clínico da endometriose, com os níveis de citocinas produzidos e o perfil da expressão de genes da resposta inflamatória. Nas amostras de swab endocervical, a prevalência de *M. hominis* (Mh), *M. genitalium* (Mg), *U. urealyticum* (Uu) e HPV foi maior no grupo caso (43,7%, 14,1%, 8,5% e 5,9% respectivamente) que no grupo controle (40,7%, 11,1%, 3,7%, 3,7% respectivamente). Nas amostras de fluido peritoneal a prevalência também foi maior no grupo caso (Mh: 27,8%; Mg: 40,7%; Uu: 3,7% e HPV: 9,6%) do que o grupo controle (Mh: 16,7%; Mg: 20,8%; Uu: 0% e HPV: 0%). Nas amostras de tecido de biópsia, as prevalências dos microrganismos foram maiores no grupo caso para *M. hominis* (5,9%) e *M. genitalium* (13,2%) do que no grupo controle (Mh: zero e Mg: 6,7%). *U. parvum*, quando detectado no swab endocervical, foi associado com a maior severidade do sintoma dispareunia (Nota de dor ≥ 7) ($p = 0,019$). A detecção de *M. genitalium* no fluido peritoneal foi associada à maior produção de IFN- γ e IL-1 β ($p < 0,05$). A produção de IL-6 no fluido peritoneal foi maior nos grupos caso infectado ou não por Mg ($p < 0,05$). A dosagem de TNF- α esteve aumentada no tecido de biópsia do grupo EDT + Mg comparado ao grupo EDT ($p < 0,05$). No tecido de biópsia de mulheres do grupo caso houve *upregulation* de genes da ativação da resposta inflamatória, ativação de macrófagos, sistema complemento e apresentação de antígeno. Comparados grupo caso e controle sem infecção, houve *downregulation* de genes da resposta inflamatória, apresentação de antígenos e fator de ativação de macrófagos nas células do fluido peritoneal. O perfil de *downregulation* de genes da inflamação foi acentuado na presença de *M. genitalium*. Perfil de *upregulation* dos genes foi observado na presença de *M. hominis*. A presença de micoplasmas, em especial *M. genitalium*, no fluido peritoneal, pode desempenhar um papel chave na manutenção desse processo de imunotolerância, principalmente pelo agravamento desse perfil. No entanto, estudos mais amplos são necessários para compreender a imunotolerância ou não às infecções bacterianas.

Palavras-chave: Mollicutes. *M. genitalium*. *M. hominis*. Endometriose. Infecção Sexualmente Transmissível.

ABSTRACT

Campos, G. B. **Participation of *Mollicutes* and genital interest microorganisms on human endometriosis.** 2016. 172 p. PhD thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Endometriosis is a disease without defined etiopathogenesis characterized by the presence of the endometrium outside of uterus. The retrograde menstruation theory justify better nowadays the most of the diagnosed cases. Based on this theory, this study aimed to detect *Mollicutes* (*Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum*), Human Papillomavirus (HPV) and *Neisseria gonorrhoeae*. The analyzed clinical samples were; endocervical swab, peritoneal fluid and biopsied lesions of endometriosis of women with endometriosis (case group) and healthy peritoneal tissues (control group). We evaluate the association between the infectious agents detected, the clinical profile of endometriosis, the cytokine secretion profile and the expression of immune response related genes. In swab samples, the prevalence of *M. hominis* (Mh), *M. genitalium* (Mg), *U. urealyticum* (Uu) and HPV it was higher in the case group (43.7%, 14.1%, 8.5% and 5.9% respectively) than the control group (40.7%, 11.1%, 3.7%, 3.7% respectively). In the peritoneal fluid samples, the prevalence of the infectious agents detected it were higher in the case group (Mh: 27.8%; Mg: 40.7%; Uu: 3.7% and HPV: 9.6%) than the control group (Mh: 16.7%; Mg: 20.8%; Uu: 0% e HPV: 0%) as well. In the biopsied tissue samples, the prevalence were higher in the case group for *M. hominis* (5.9%) and *M. genitalium* (13.2%), compared to the control group (Mh: 0% e Mg: 6.7%). *U. parvum* when detected in swab samples it was associated to the severity of the symptom dyspareunia ($EAD \geq 7$) ($p = 0.019$). *M. genitalium* when detected in the peritoneal fluid was associated to the higher production of IFN- γ e IL-1 β ($p < 0.05$). Increased IL-6 levels in peritoneal fluid occurred in the case and case + Mg groups ($p < 0.05$). TNF- α was more produced in the case group + Mg biopsied tissue when compared to the case group without infection ($p < 0.05$). In the group case, biopsied tissue genes of inflammatory response activation, macrophages activation, complement system and antigen presentation were upregulated. Comparing case and control groups without infection, genes associated to the inflammatory response, antigen presentation and macrophages activation factor were in downregulation in peritoneal fluid cells. Downregulation of inflammation genes was higher in presence of *M. genitalium*. Upregulation of the same genes occurred in the presence of *M. hominis*. The presence of mycoplasmas, particularly *M. genitalium* in intraperitoneal fluid, can play a key role to maintain an immune tolerance, mainly by the worsening of this profile. However, wider studies are necessary to understand better this immune tolerance to infectious agents.

Keywords: Mollicutes. *M. genitalium*. *M. hominis*. Endometriosis. Sexually Transmitted Infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Célula de <i>M. genitalium</i> (G-37), não fixada e negativamente corada (x 750 000)	33
Figura 2 – Dependente ciclo de vida do Papilomavírus humano.....	41
Figura 3 – Padrões histológicos da endometriose.....	46
Figura 4 – Estadiamento da endometriose proposto pela <i>American Society for Reproductive Medicine</i> - ASRM (1996)	57
Figura 5 – Proporção de detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras de <i>swab</i> endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia obtidas de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	76
Figura 6 – Proporção de detecção de micoplasmas e outros microrganismos de interesse genital entre as mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle) em amostras de <i>swab</i> endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia obtidas de mulheres com e sem endometriose, São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	77
Figura 7 – Quantificação absoluta por qPCR do número de cópias de espécies de micoplasmas (Cópias/mL) em amostras de <i>swab</i> endocervical mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	79
Figura 8 – Quantificação absoluta por qPCR do número de cópias de espécies de <i>Mollicutes</i> em amostras de fluido peritoneal de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	80
Figura 9 – Quantificação absoluta por qPCR do número de cópias de espécies de micoplasmas em amostras de tecido de biópsia em mulheres com e sem endometriose, São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	80
Figura 10 – Quantificação de citocinas em amostras de fluido peritoneal de mulheres sem endometriose (grupo controle) e mulheres com endometriose (grupo caso)	89
Figura 11 – Quantificação de citocinas em amostras de tecido de biópsia de mulheres sem endometriose (grupo controle) e mulheres com endometriose (grupo caso)	91
Figura 12 – Quantificação de citocinas em amostras de tecido de biópsia de mulheres sem endometriose (grupo controle) e mulheres com endometriose (grupo caso)	92
Figura 13 – Análise de expressão gênica no tecido de biópsia de mulheres com endometriose (grupo caso) comparado com tecido de biópsia de mulheres sem endometriose (grupo controle).....	93
Figura 14 – Análise de expressão gênica nas células do fluido peritoneal de mulheres com endometriose (grupo caso) comparado fluido peritoneal de mulheres sem endometriose (grupo controle)	95
Figura 15 – Análise de expressão gênica de células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose positivas para <i>M. genitalium</i> comparado com células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose sem infecção por micoplasmas.....	97
Figura 16 – Análise de expressão gênica de células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose positivas para <i>M. hominis</i> comparado com células presentes no fluido	

peritoneal de mulheres com endometriose sem infecção por micoplasmas.....99

Figura 17 – Análise de expressão gênica de células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose positivas para qualquer micoplasma comparado com células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose sem infecção por micoplasmas.....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes avaliados pelo kit <i>Human Innate and Adaptive Immune Responses PCR Array</i>	66
Tabela 2 – Características demográficas da população estudada.....	69
Tabela 3 – Características clínicas da população estudada e distribuição das pacientes de acordo com as classificações da endometriose.....	71
Tabela 4 – Hábitos de vida da população estudada.....	72
Tabela 5 – Perfil de detecção de espécies de <i>Mollicutes</i> (<i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i>), HPV e <i>N. gonorrhoeae</i> , em amostras de swab endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia obtidas de mulheres com e sem endometriose, São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	74
Tabela 6 – Detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras de swab endocervical por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP.....	82
Tabela 7 – Perfil de Detecção de HPV por amostra clínica e de <i>N. gonorrhoeae</i> no swab endocervical, por meio da qPCR, e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.....	84
Tabela 8 – Detecção de <i>Mollicutes</i> , HPV e <i>N. gonorrhoeae</i> em amostras de swab por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico das pacientes incluídas.....	85
Tabela 9 – Detecção de <i>Mollicutes</i> , HPV e <i>N. gonorrhoeae</i> em amostras de fluido peritoneal por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico das pacientes incluídas.....	86
Tabela 10 – Detecção de <i>Mollicutes</i> , HPV e <i>N. gonorrhoeae</i> em amostras de tecido por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico das pacientes incluídas.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A –	Adenina
AIDS –	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC –	Célula Apresentadora de Antígeno
ASRM –	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
atm –	Atmosfera
ATP –	Adenosina tri-fosfato
C –	Citosina
cDNA –	DNA circular
CDC –	Centers for Disease Control and Prevention
CO ₂ –	Gás carbônico
Ct –	Cycle Treshold (Sinal de fluorescência que pode ser detectado)
DAMPS –	Padrões Moleculares Associados a Danos
DIP –	Doença Inflamatória Pélvica
DIU –	Dispositivo Intrauterino
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP –	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDT –	Endometriose
EDTA –	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
g –	Força G (gravitacional)
G –	Guanina
HIV –	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV –	Papilomavírus humano
IC –	Intervalo de Confiança
IFN-γ –	Interferon gama
Ig –	Imunoglobulina
IL –	Interleucina
IL-1α	Interleucina 1 Alfa
IL-1β –	Interleucina 1 Beta
IST –	Infecção Sexualmente Transmissível
kDa –	Kilodaltons
Kpb –	Kilopares de bases
LPS –	Lipopolissacarídeo
mg –	Miligramas
MgCl ₂ –	Cloreto de Magnésio
mín. –	Mínima
máx, -	Máxima
MHC –	Complexo Maior de Histocompatibilidade
mL –	Mililitro
mM –	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NK –	Natural Killers
°C –	Graus celsius
OMS –	Organização Mundial de Saúde
OR –	Odds Ratio
PAMP –	Padrão Molecular Associado a Patógenos
pb –	Pares de base
PBS –	Tampão fosfato (Phosphate Buffer Saline)

PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
pH –	Potencial hidrogênio iônico
pmol –	Picomol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPLO –	Pleuropneumonia-like Organisms
qPCR –	PCR quantitativa ou PCR em tempo real
r^2 –	R da curva
RNA _m –	Ácido ribonucleico mensageiro
rRNA –	RNA ribossômico
SC –	Small Colony
T –	Timina
TCLE –	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th –	Células T helper
TLR –	Toll-like receptor
TNF –	Fator de Necrose Tumoral
U –	Unidade
UNG –	Uretrite não gonocócica
μ L –	Microlitro
μ m –	Micrômetros
μ M	Micromolar
nm –	Nanômetros
μ m/s –	Micrômetros por segundo
VB –	Vaginose bacteriana
x –	Vezes (multiplicação)
α –	Alfa
β –	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	25
2.1 Características gerais dos <i>Mollicutes</i>.....	25
2.1.1 <i>Mycoplasma genitalium</i>	32
2.1.2 <i>Mycoplasma hominis</i>	35
2.1.3 <i>Ureaplasma spp.</i>	37
2.2 Outros microrganismos de importância ginecológica.....	39
2.2.1 Papilomavírus humano (HPV).....	39
2.2.2 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	42
2.3 Endometriose.....	43
2.3.1 Quadro Clínico.....	44
2.3.2 Epidemiologia da Endometriose.....	45
2.3.3 Classificação da endometriose.....	45
2.3.4 Teorias da Endometriose.....	47
2.3.5 Sistema imune e endometriose.....	48
2.3.6 Microrganismos patogênicos e endometriose.....	49
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	54
4.1 Pacientes.....	54
4.1.1 Locais do estudo e pacientes.....	54
4.1.2 Critérios de inclusão.....	54
4.1.3 Quadro clínico.....	55
4.1.4 Estadiamento da Endometriose.....	56
4.1.5 Locais da doença.....	58
4.2 Coleta de amostras e processamento em laboratório.....	58
4.2.1 Swab endocervical.....	58
4.2.2 Fluido Peritoneal.....	58
4.2.4 Lesão de Endometriose.....	59
4.3 Padronização das cepas utilizadas.....	59

4.4 Extração de DNA.....	60
4.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	60
4.5.1 Reação de controle interno da qualidade do DNA.....	60
4.5.2 qPCR para detecção de <i>M. genitalium</i>	61
4.5.3 qPCR para a detecção de <i>M. hominis</i>	61
4.5.4 qPCR para detecção de <i>U. urealyticum</i>	62
4.5.5 qPCR para detecção de <i>U. parvum</i>	62
4.5.6 qPCR para detecção de <i>N. gonorrhoeae</i>	62
4.5.7 Análise dos dados da PCR quantitativa.....	63
4.5.8 PCR para detecção de Papilomavírus humano (HPV).....	63
4.6 Dosagem de citocinas.....	64
4.7 Análise de expressão gênica.....	64
4.8 Análise estatística.....	68
5 RESULTADOS.....	69
5.1 Características demográficas da população estudada.....	69
5.2 Características clínicas da população estudada.....	70
5.3 Hábitos de vida da população estudada.....	72
5.4 Perfil de prevalência dos microrganismos na população estudada.....	72
5.4.1 Perfil de prevalência dos Microrganismos Vs Uso de hormônios...	74
5.5 Perfil de coinfeção e proporção de microrganismos nos grupos de estudo.....	75
5.6 Perfil de carga microbiana dos <i>Mollicutes</i> nas amostras	78
5.7 Detecção microbiana de acordo com o perfil clínico.....	81
5.8 Padrões de resposta imune na população estudada.....	88
5.9 Perfil da expressão gênica na população estudada.....	93
6 DISCUSSÃO.....	102
7 CONCLUSOES.....	116
REFERÊNCIAS.....	118
APÊNDICES.....	141
A – Tipo de cirurgia realizada por grupo de estudo.....	141
B – Ficha de atendimento ginecológico ambulatorial.....	144

C – Perfil de prevalência dos <i>Mollicutes</i> nas amostras swab endocervical de acordo com o uso de hormônio.....	147
D – Perfil de prevalência dos <i>Mollicutes</i> nas amostras de fluido peritoneal de acordo com o uso de hormônio.....	148
E – Perfil de prevalência dos <i>Mollicutes</i> nas amostras de tecido de biópsia de acordo com o uso de hormônio.....	149
F – Perfil de prevalência de HPV por amostra clínica e <i>N. gonorrhoeae</i> nas amostras de swab de acordo com o uso de hormônio.....	150
G – Prevalência de coinfeção de <i>Mollicutes</i> (<i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i>), HPV e <i>N. gonorrhoeae</i> em amostras de swab endocervical de mulheres com e sem endometriose, São Paulo - SP, 2014.2 – 2015.1.	151
H – Prevalência de coinfeção de micoplasmas genitais (<i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i>) em amostras de fluido peritoneal de mulheres com e sem endometriose, São Paulo - SP, 2014.2 – 2015.1.....	152
I – Prevalência de coinfeção de micoplasmas genitais (<i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i>) em amostras de tecido de biópsia de mulheres com e sem endometriose, São Paulo - SP, 2014.2 – 2015.1.....	153
J – Detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras de fluido peritoneal por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	154
K – Detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras de tecido de biópsia por PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	155
L – Detecção de HPV e <i>N. gonorrhoeae</i> em amostras clínicas por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.....	156

M – Detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras de <i>swab</i> endocervical por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.....	158
N – Detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras de fluido peritoneal por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.....	159
O – Detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras de tecido de biópsia por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.....	160
ANEXOS	161
A – Parecer 1170/CEPSH.....	162
B – Parecer AVAP GBC 260.....	163
C – Parecer nº 550.484.....	164
D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	165
E – Escala Analógica de Dor (EAD)	167
F – Questionário de dados clínicos do Setor de Endometriose do Hospital das Clínicas.....	168

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma desordem ginecológica estrógeno-dependente caracterizada pela presença de tecido endometrial fora do útero – principalmente no peritônio pélvico (ACIEN; VELASCO, 2013; GIUDICE; KAO, 2004). O quadro clínico da endometriose é bastante variável. Algumas pacientes podem ser assintomáticas, no entanto, a maioria apresenta queixas clínicas em diferentes intensidades, como dismenorreia, dor pélvica crônica, infertilidade, dispareunia de profundidade, sintomas intestinais e urinários cíclicos como dor ou sangramento ao evacuar/urinar durante o período menstrual e fadiga crônica (BELLELIS; PODGAEC; ABRÃO, 2011; NACUL; SPRITZER, 2010). Dentre outros fatores, a eventual inespecificidade do quadro clínico e a falta de correlação entre sintomas e gravidade da doença podem explicar a demora no diagnóstico da endometriose (BELLELIS et al., 2011).

Diferentes teorias têm sido propostas para explicar a endometriose. Dentre estas estão: (1) Teoria da metaplasia celômica (Teoria de Mayer); (2) Teoria da Implantação de Sampson (crescimento do endométrio após a menstruação retrógrada) e (3) Teoria da Indução. A teoria de Mayer propõe que a endometriose se estabeleça por meio da transformação celular hormônio-dependente das células peritoneais em células do tipo Mulleriano. De acordo com a teoria da implantação, no fenômeno da menstruação retrógrada o tecido endometrial fluiria através das tubas de falópio até alcançar a cavidade peritoneal. Ao alcançar este sítio anatômico o tecido endometrial pode se implantar e crescer. Finalmente, a teoria da indução é uma combinação das duas primeiras teorias e propõe que fatores biomecânicos e imunológicos induzem células indiferenciadas para diferenciadas em tecido endometrial (AUGOULEA et al., 2012; MEYER, 1919; SAMPSON, 1927; VINATIER et al., 2001).

A teoria da menstruação retrógrada explica a maior parte dos fenômenos associados à patogênese da doença e, portanto, é mais aceita atualmente. Contudo, se este fenômeno é comum e ocorre na maioria das mulheres, questiona-se: por que apenas 10% destas desenvolvem a doença? Duas hipóteses para a progressão da doença foram postuladas: (1) Anomalias intrínsecas do endométrio eutópico permitem a resistência à eliminação pelas células imunes peritoneais e (2) a doença é uma consequência da função

alterada de macrófagos e células *natural killer* (NK), as quais são incapazes de eliminar os implantes endometrióticos. A relação entre estas duas hipóteses não está clara; estas são provavelmente interdependentes (ACIEN; VELASCO, 2013).

Para além destas hipóteses, recentemente, aumentou-se o interesse ao da relação entre a patogênese da endometriose e a possível participação microrganismos (KHAN et al., 2010; KHAN et al., 2014; KHAN et al., 2015; KHAN et al., 2016; KOBAYASHI et al., 2014). O trato genital inferior está exposto à colonização por microrganismos capazes de ascender e infectar o trato genital superior (DEB; CHATTURVEDI; JAISWAL, 2004; LARSEN; GALASK, 1980; WIRA et al., 2005). Com base neste aspecto, na “teoria da contaminação bacteriana ou infecciosa” propôs-se que a ativação bacteriana via LPS/TLR-4 pode provocar inflamação pélvica com aumento da endometriose (KHAN et al., 2010). Em outro estudo, Khan et al., (2014) encontraram altas concentrações de *Escherichia coli*, *Gardnerella* spp., *Streptococcus* (alfa-hemolíticos) e enterococos em amostras de endométrio de mulheres com endometriose, e subsequente alto nível de endotoxina. O estudo reforçou o argumento de que microrganismos presentes na cavidade uterina podem provocar uma infecção subclínica no ambiente intrauterino e nos endometriomas de ovário. Estes autores propõem como possível explicação para seus achados que a menstruação retrógrada seja o fenômeno que carregou os microrganismos até os ovários. Desta forma, apoiaram-se na teoria de Sampson para postularem suas suspeitas.

Neste contexto, a presença de microrganismos no útero pode ser importante na iniciação da endometriose. A ativação da resposta imune por estímulo microbiano nos receptores de reconhecimento de patógenos (RRP) resulta na ativação de vias pró-inflamatórias e da imunidade inata. Somado à resposta a vários padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os receptores *Toll-like* também reconhecem ampla variedade de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). A expressão aumentada dos níveis de DAMPs pode estar envolvido em um subsequente processo de transcrição nuclear dependente do fator- $\kappa\beta$ (KOBAYASHI et al., 2014).

Diante do exposto, consideramos que há pouco conhecimento da participação dos micro-organismos na evolução e desenvolvimento da

endometriose. Há fortes indícios de que os microrganismos são carregados para o trato reprodutivo superior por meio da menstruação retrógrada. Assim, o presente estudo se propõe a investigar a hipótese se microrganismos de importância clínico-ginecológica, podem influenciar na resposta imune local e contribuir para o desenvolvimento da endometriose. Somado a este estudo, serão observados os aspectos demográficos da população incluída com vistas a avaliar os aspectos associados ao perfil clínico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais dos *Mollicutes*

Há mais de 100 anos, fizeram o primeiro relato de micoplasmas (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC - agente da pleuropneumonia bovina) (NOCARD; ROUX, 1990). Com o passar dos anos, microrganismos, ainda denominados PPLO (*pleuropneumonia-like organisms*), foram isolados de humanos e de animais por outros pesquisadores. Atualmente, estes recebem a denominação proposta por Edward e Freundt (1956): Micoplasmas. Esta nomenclatura é usada informalmente quando se fala de bactérias pertencentes à classe *Mollicutes*. Apesar de informais, termos como micoplasmas ou molicutes têm sido utilizados indiferenciadamente pelos autores para denotar qualquer espécie dentre os *Mollicutes* (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Taxonomicamente, a ausência completa da parede celular separa os micoplasmas de outras bactérias em uma classe denominada *Mollicutes* (mollis: mole; cutis: pele, em latim) (RAZIN, 1978). Atualmente são reconhecidas cinco ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incertae sedis*), seis famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothrichaceae*) e 14 gêneros (*Mycoplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium*) (BERGEY'S, 2010; RAZIN, 1997).

Os *Mollicutes* possuem um genoma e metabolismo reduzido, e são considerados os menores organismos capazes de autorreplicação. A espécie *Mycoplasma genitalium* apresenta genoma de 580 Kpb, sendo o menor genoma dentre os procariotos de vida livre (BERGEY'S, 2010; BOVÉ, 1999; RAZIN, 1997; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Filogeneticamente, com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, são relacionadas às bactérias gram-positivas com baixo conteúdo G+C (23 - 40%) (MANILOFF et al., 1992). Por um processo de evolução reductiva do seu genoma e provavelmente influenciado pelos nichos encontrados, estas bactérias desenvolveram características fenotípicas e metabólicas diferenciadas (PERRY; KASPER, 2000).

O tamanho do genoma divide estas bactérias em dois grupos: (1) composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, com aproximadamente 580 a 1350 Kpb e, (2) formado pelos gêneros *Acholeaplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma* com genoma variando de 790 a 2200 Kpb (MILES; NICHOLAS, 1998). A ausência de parede celular propicia o pleomorfismo destas bactérias. Alguns gêneros apresentam-se helicoidais, esféricos ou periformes, com ou sem filamentos. Os filamentos ocorrem pela assincronia entre a divisão celular, mais rápida, e a replicação genômica; assemelhando-se aos dos fungos (*mykes*: fungo e *plasma*: formação). Os micoplasmas não possuem flagelos, mas algumas espécies exibem motilidade por deslizamento em superfície de plástico ou vidro. Estas espécies normalmente apresentam uma organela ou estrutura especializada na extremidade da célula (*tip organelle*) a qual desempenha um papel na adesão às células hospedeiras. Pequenos e maleáveis, os micoplasmas foram também confundidos no passado com vírus por transporem usualmente os filtros retentores da maioria das bactérias (RAZIN; TULLY, 1995).

No cultivo em meio sólido, as colônias possuem de 50 a 500 µm de diâmetro e têm aspecto de “ovo frito”. Incorporadas no Agar, as colônias têm uma zona central opaca, granular e refringente e outra plana e translúcida na superfície do meio. No entanto, esta morfologia depende das condições de crescimento, idade da cultura e da concentração do ágar. Poucas espécies não apresentam as colônias em forma “ovo frito” sob quaisquer condições de cultivo. Em meio líquido, o crescimento geralmente não causa turvação, provocando a alteração de cor no caldo revelado por um indicador de alteração de pH. Neste sentido, apesar de a coloração de Gram não permitir a identificação por não apresentarem parede celular, esta técnica serve para evidenciar a contaminação por outras bactérias nos caldos de cultivo (RAZIN, 1987; RAZIN; TULLY, 1995).

Na caracterização morfológica dos micoplasmas, a microscopia óptica apresenta-se como técnica utilizada na visualização de estruturas mais grosseiras. A microscopia eletrônica, por sua vez, permite a visualização detalhada da ultraestrutura destes microrganismos e desta forma, a demonstração de uma membrana em finas secções; requisito para a identificação de um novo isolado como um *Mollicutes* (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Os micoplasmas são encontrados em humanos, mamíferos, aves, répteis, peixes, artrópodes e plantas. Novas espécies de hospedeiros e de *Mollicutes*

são frequentemente mencionados na literatura (HORNOK et al., 2012; LO et al., 1991; MAGGI et al., 2013; VERTERAMO et al., 2013). Micoplasmas usualmente exibem uma relação estrita e específica com o tecido do seu hospedeiro, provavelmente por conta do modo de vida parasitário e por serem nutricionalmente exigentes (RAZIN et al., 1998; ROTTEM; NAOT, 1998). Entretanto, Goulet et al., (1995) mencionam existem variações nesta relação e, eventualmente, é possível isolar espécies de sítios de hospedeiros não-usuais. *M. pneumoniae* pode encontrado preferencialmente no trato respiratório, e *M. genitalium* tem sido isolado do trato urogenital, mas o contrário também pode ocorrer. *M. salivarum* foi isolado da secreção nasal e orofaríngea de suínos, mesmo este sendo comumente encontrado na cavidade bucal humana. *Acholeplasma oculi*, um micoplasma que foi detectado em vários animais, foi isolado de líquido amniótico de uma mulher. Apesar dos relatos, o mecanismo de indução da susceptibilidade do hospedeiro a micoplasmas incomuns ainda é incerto (BOVÉ, 1999; ERICKSON; ROSS; BOVE, 1988; RAZIN et al., 1998; WAITES; CROUSE; CASSELL, 1993).

O isolamento de *Mollicutes* de amostras clínicas depende de várias condições inerentes aos hospedeiros ao material colhido; além do tempo decorrido até o início da cultura. Inclui-se a presença de anticorpos, antibióticos, componentes tóxicos ou inibidores, qualidade dos meios de cultura e condições de incubação. Adicionalmente, vale considerar que algumas espécies são muito fastidiosas. Desta maneira, as técnicas de diagnóstico molecular são cada vez mais aplicadas (AMIRMOZAFARI et al., 2009; BALABANOV et al., 2006; TULLY, J. G., 1993).

As principais espécies que parasitam humanos encontram-se nos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, os quais possuem metabolismos distintos. Pela forma de obtenção de ATP, os mollicutes em geral, são divididos em fermentadores da glicose, acidificando o caldo de cultura ou aqueles que alcalinizam pela hidrólise da arginina. No entanto poucas espécies possuem as duas vias ou algumas obtêm energia por outras vias (BROWN; WHITCOMB; BRADBURY, 2007; OLSON et al., 1993). As espécies do gênero *Ureaplasma* requerem ureia para produzir ATP, hidrolisando este composto e produzindo amônia (BROWN et al., 2007; POLLACK; JONES; WILLIAMS, 1993). Quando são isolados de matérias clínicos contaminados, adicionam-se impedientes aos

meios de cultura como penicilina, acetato de tálio e antifúngicos. Algumas espécies requerem cofatores complexos pelas limitações metabólicas e/ou nutricionais. Também deve-se considerar a produção de compostos do metabolismo primário e o esgotamento de nutrientes essenciais como fatores estressantes que prejudicam os subcultivos ou mesmo inviabilizando a multiplicação (MILES, 1992; ROSENGARTEN et al., 2000; TULLY, 1993).

A maioria dos *Mollicutes* são facultativos, e geralmente preferem atmosfera com pouco oxigênio, principalmente no primocultivo. O gênero *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma* abarcam poucas das espécies que são pouco estudados e são anaeróbios estritos. Somente poucas espécies, como *M. hyorhinis* de suínos, requerem atmosfera anaeróbica, sendo que a aeração pode contribuir para o crescimento de algumas espécies, presumivelmente, por contribuir na produção de ATP gerado durante o metabolismo da glicose e outros carboidratos (KOTANI et al., 1990; MILES, 1992).

A maioria dos *Mollicutes* isolados do homem e de animais exibem temperatura ótima de crescimento de 36 °C a 38 °C, enquanto que *Acholeplasma* spp. podem se multiplicar em temperatura ideal igual ou abaixo de 22 °C (TULLY, 1983). Os mollicutes geralmente sobrevivem em uma faixa estreita de intervalo de pH. Para espécies encontradas em plantas e vertebrados, o pH ótimo é de 7,4 e o crescimento ocorre entre pH 6,5 a 8,0. Os ureaplasmas são exceções, sendo o pH ótimo de 6,0 a 6,5, sendo seu crescimento inibido em pH acima de 7,5 (RAZIN, 1978). A pressão osmótica ideal durante o crescimento de algumas espécies de *Mycoplasma* e para *Acholeplasma laidlawii*, em meio líquido ou sólido, foi próximo a 10 atm (LEACH, 1962). Contudo, variações entre os diferentes gêneros e espécies, podem atingir valores de 6,5 a 32 atm, como no caso dos Spiroplasmas. Desta forma, o estabelecimento da osmolaridade constitui outro aspecto importante no desenvolvimento dos mollicutes (MILES; NICHOLAS, 1998).

A maioria dos *Mollicutes* vivem como comensais e, em muitos artrópodes, podem mesmo ser considerados simbioses. Infecções com micoplasmas patogênicos são raramente agudas e usualmente seguem um curso crônico (RAZIN, 1997). Os *Mollicutes*, principalmente as espécies encontradas em mamíferos, apresentam-se como "parasitas ideais", e vivem, geralmente, em homeostase com o hospedeiro, mas, por outro lado, são também considerados

como “oportunistas ideais”. Diversas doenças nos seus respectivos hospedeiros são causadas ou associadas aos *Mollicutes* (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Estas bactérias parecem preferir nichos com células em constante renovação, como mucosas, favorecendo a sua adesão. Algumas apresentam a capacidade de aderir e/ou invadir células fagocíticas e não-fagocíticas, tais como células epiteliais dos tratos respiratório, urogenital, gastrointestinal, das glândulas mamárias e até mesmo de olhos e articulações (BIERNAT-SUDOLSKA et al., 2011). A propriedade de invasão em células humanas foi descrita inicialmente para *M. penetrans*, mas espécies de diferentes gêneros também têm sido descritas (BUIM et al., 2011; MARQUES et al., 2010; UENO et al., 2008).

A capacidade de adesão e/ou invasão é facilitada primeiramente pelo o alto teor de colesterol na membrana de micoplasmas, contribuindo para que ocorra fusão com as células do hospedeiro. Além disso, alguns microrganismos apresentam uma extensão celular polar, afunilada em um dos pólos, contendo um núcleo eletrodense no citoplasma. Esta estrutura, denominada *tip organelle*, funciona como uma organela de adesão e/ou de invasão, devido às adesinas presentes (BASEMAN et al., 1995; JENSEN; BLOM; LIND, 1994; KRAUSE; CHEN, 1988; ROTTEM, 2003). Outros micoplasmas apresentam bolsas na membrana que se assemelham a poços revestidos, onde a adesão e invasão nas células ocorre por um evento mediado por receptores que se assemelham ao mecanismo de invasão de *Chlamydia* (MERNAUGH et al., 1993). Após a invasão, alguns permanecem viáveis em vacúolos (JENSEN et al., 1994), e outros localizam-se, principalmente, na região perinuclear (BASEMAN; TULLY, 1997).

Propriedades biológicas dos micoplasmas têm sido descritas como determinantes de virulência. Estas incluem: 1) a geração de peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido por micoplasmas aderentes, os quais induzem o estresse oxidativo, incluindo dano à membrana da célula hospedeira; 2) competição por nutrientes ou precursores biossintéticos, interferindo no metabolismo da célula hospedeira e sua função; 3) existência de glicocálix ou estruturas eletrodensas na superfície da bactéria com propriedades imunomoduladoras 4) alta frequência de variação de fase que resulta na diversidade antigênica na superfície bacteriana possibilitando a modificação da resposta imune do hospedeiro; 5) secreção ou introdução de enzimas

bacterianas como: fosfolipases, ATPases, hemolisinas, proteases e nucleases para o interior da célula hospedeira, causando aberrações cromossômicas e desorganização da função tissular e 6) permanência intracelular dificultando a ação de antibióticos e dos mecanismos de resposta imune contribuindo na cronicidade das doenças (CHANG et al., 2011).

O quadro clínico das infecções por micoplasma em humanos e animais é mais sugestiva do efeito da modulação da resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro do que pelos efeitos tóxicos de componentes gerados pelos microrganismos (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Assim, a adesão pode ser considerada o maior fator de virulência, pois pode interferir tanto com receptores quanto com os mecanismos de transporte da célula hospedeira. Esses eventos podem levar à ativação de cascatas e vias de sinalização nestas células (HOPFE et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2013).

Os *Mollicutes* apresentam afinidade pela membrana plasmática das células epiteliais, não fibroblásticas e de linfócitos (ZUO; WU; YOU, 2009). Tornou-se evidente o estímulo do sistema imune hospedeiro pelos micoplasmas, refletida por um aumento da expressão de moléculas de superfície, da proliferação e a diferenciação das células do sistema imune. Ocorre ainda aumento das funções efetoras manifestadas pela liberação de diversos mediadores solúveis, que interferem na relação dos molicutes e as células imunológicas do hospedeiro (RAZIN et al., 1998).

A maioria dos molicutes estudados estimulam macrófagos e monócitos na secreção de citocinas pró-inflamatórias com atividade local e sistêmica nos hospedeiros. Foram associados aos efeitos inibitórios e/ou mitogênicos sobre linfócitos B e T, estímulo de células *Natural Killers* (NK) e aumento na produção das citocinas IL-6, IL-1 α e IL-1 β e IL-2 (LARSEN; HWANG, 2010; SUN et al., 2013; XU et al., 2013).

O TNF- α é um mediador principal da inflamação, febre, liberação de proteínas de fase aguda, choque séptico, e necrose hemorrágica das células tumorais. Esta citocina é produzida principalmente por fagócitos mononucleares, mas também por células T helper (Th), natural killers (NK) e outras células não relacionadas diretamente ao sistema imune. Uma vez que a maior parte das atividades de TNF- α se sobrepõem com IL-1 (um dos mediadores da inflamação produzido por fagócitos mononucleares e outras células), estas duas citocinas

são discutidas em conjunto. O TNF- α e IL-1 são cofatores importantes na ativação de linfócitos T e B, e promovem a proliferação e diferenciação de linfócitos em células efetoras. Ambas as citocinas regulam positivamente a atividade citocida de macrófagos e células NK e aumentam a atividade metabólica de polimorfonucleares. Ao induzir o aumento da expressão de antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), potencializam a apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). As células do sistema imune que são estimuladas por TNF- α e IL-1 expressam maiores níveis de receptores de citocinas, α - e β -quimiocinas e prostaglandinas. A capacidade do TNF- α e IL-1 em causar aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, em conjunto com outros fatores, provoca o aumento do recrutamento de leucócitos a locais de inflamação. Além disso, favorecem a necrose local e a destruição do tecido. Apesar de doses elevadas de TNF- α levar à inibição, “in vitro”, da replicação de células progenitoras da medula óssea, tanto o TNF- α e IL-1 estimulam a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Isso estimula a hematopoese “in vivo”, aumentando o conjunto de células a serem estimuladas e a quimiotaxia ao sítio da inflamação. Tais efeitos induzidos por ambas citocinas, em resposta às interações com micoplasmas, podem justificar boa parte das manifestações inflamatórias e patológicas nas infecções por mollicutes (MCGOWIN; et al., 2009; MCGOWIN; POPOV; PYLES, 2009; PELTIER et al., 2007; WOOLARD et al., 2005; WU et al., 2008; YOU et al., 2008).

IL-6 é outra citocina pleiotrópica e pró-inflamatória induzida por muitos mollicutes. Esta citocina é produzida por monócitos e macrófagos, bem como por Th e linfócitos B e outras células não relacionadas diretamente ao sistema imune. IL-6 exibe algumas atividades que se sobrepõem aos do TNF- α e IL-1. No entanto, a sua principal atividade é mediada pela capacidade de agir como cofator na diferenciação de células B e maturação em células secretoras de imunoglobulinas (Ig). A IL-6 também aumenta a expressão de receptor IL-2 (IL-2R) em células ativadas e induz a produção de IL-2 por Th. Isso promove a proliferação de linfócitos T e amplifica a hematopoese. IL-6, assim como TNF- α e IL-1, também desencadeia a produção de proteínas de fase aguda no fígado. Vale salientar que, exceto por *M. hyopneumoniae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, e *M. salivarium*, todos os micoplasmas que induzem a produção e

liberação de IL-6 foram identificados como mitógeno para linfócitos B de ratos (DOH et al., 2004; MCGOWIN et al., 2012; THANAWONGNUWECH et al., 2001).

Há mais de 50 anos associou-se à etiologia de *M. pneumoniae* com a pneumonia atípica humana e *U. urealyticum* com a uretrite não gonocócica (UNG). No entanto, outras espécies de micoplasmas foram identificadas como parte da microbiota humana. Apesar da ocorrência de diversos esclarecimentos na biologia destas bactérias em humanos, existe pouco conhecimento do papel destas bactérias quando são comensais ou quando causam doenças (KRAUSE et al., 1982). Este aspecto continua indefinido em algumas doenças humanas envolvendo *M. hominis*, *M. genitalium* e *U. urealyticum* nos abortos espontâneos e neonatos de baixo peso ao nascer. *M. penetrans*, por sua vez, foi considerado possível cofator da AIDS. Clamídias e micoplasmas são os principais agentes das UNG e são encontrados com frequência no trato urogenital de indivíduos aparentemente saudáveis. O efeito de um agente sobre o outro é também desafiador ao conhecimento da biologia destas bactérias. As inter-relações entre as espécies podem ocorrer nos diferentes contextos, como nas culturas celulares, em estudos com modelos animais e na situação clínica (TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011).

Apesar das dificuldades de se correlacionar o resultado do isolamento de micoplasmas em amostras genitais e a etiologia de infecções no sítio anatômico, a detecção destes microrganismos é de extrema importância. Esta relevância ocorre por estes agentes estarem envolvidos em doenças como as vaginoses, uretrites e doença inflamatória pélvica considerando-se os desconfortos gerados, as possíveis complicações consequentes destes distúrbios e a possibilidade de transmissão sexual. Desta forma, assumem papel importante ao constituir um problema de saúde pública, que necessita assistência médica adequada, sobretudo no tratamento, mesmo quando envolvidos em doenças consideradas de menor gravidade (AVELAR et al., 2007).

2.1.1 *Mycoplasma genitalium*

Tully (1993) isolou pela primeira vez *M. genitalium* a partir de duas amostras de swab uretral de homens com Uretrite Não Gonocócica (UNG). Na

ocasião, foi encontrado, nos esfregaços de amostra uretral, a presença de clamídia, *Ureaplasma* spp., *M. hominis*, e outro microrganismo que por vezes revelava motilidade em forma espiral. Após inocularem as amostras em meio SP4, recuperaram em cultura este último microrganismo.

Quanto à forma e estrutura celular, *M. genitalium* predominantemente apresenta-se em forma de “garrafa” sendo a estrutura terminal envolvida na adesão às superfícies celulares (Figura 01). Possui entre 0,6 e 0,7 μm no comprimento, de 0,3 a 0,4 μm na largura da base e de 0,06 a 0,08 μm na extremidade. Ao microscópio eletrônico de transmissão, evidenciou-se também a tripla camada na membrana com 7,5 a 10 nm de largura sendo a camada intermediária mais eletrodensa em relação às demais. A estrutura terminal promove a motilidade por deslizamento e muitas cepas se movem por meio de movimentos rotatórios em sentido horário. A velocidade de locomoção pode chegar a 0,1 $\mu\text{m}/\text{s}$ (HAGGERTY; TAYLOR, 2011).

Figura 1 – Célula de *M. genitalium* (G-37), não fixada e negativamente corada (x 750 000).

Legenda: A seta indica a porção terminal com a qual a célula adere às células hospedeiras.
Fonte: Tully e Taylor-Robinson, 1981.

M. genitalium é capaz de metabolizar glicose, contudo, não metaboliza arginina ou ureia. Esta característica é utilizada na detecção em meio de cultura uma vez que a diminuição do pH contribui na identificação. A temperatura ótima de crescimento é de 37 °C, e as colônias se desenvolvem em atmosfera de nitrogênio com 5% de CO₂. Seu crescimento é inibido com a concentração de 0,05% de acetato de tálio. Além disso, não produz fosfatase ou filme e manchas

no ágar, no entanto, reduz tetrazólio anaerobicamente e sua colônia exibe hemadsorção com eritrócitos de carneiro “in vitro”. O conteúdo de G + C do DNA é de $32,4 \pm 1,0$ %/mol. O genoma foi totalmente sequenciado por Fraser et al., (1995), e com aproximadamente 600 Kb esta espécie possui o menor genoma relatado de um organismo capaz de autorreplicação. *M. genitalium* possui semelhança genética de 98% com *M. pneumoniae*. A proteína de adesão MgPa, é reconhecida por desempenhar papel fundamental na adsorção a eritrócitos, células VERO e células epiteliais das trompas de falópio (JENSEN, 2004; JENSEN et al., 1991; MOBLEY et al., 2012; MOI; REINTON; MOGHADDAM, 2009).

Nos últimos anos tem aumentado o interesse em se entender melhor *M. genitalium*. O documento mais recente do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) sobre tratamento das ISTs, publicado em 2015, discute *M. genitalium* sob a ótica de um problema emergente (WORKOWSKI et al., 2015). Nos últimos anos, diferentes pesquisadores iniciaram-se estudos para comprovar que *M. genitalium* é de fato uma nova IST (MUNOZ; GOJE, 2016; SONNENBERG et al., 2015).

Embora algumas das características clínicas e a cronologia da infecção ainda não estejam esclarecidas, os homens mais infectados apresentam uretrite, muitos com corrimento, enquanto as mulheres podem apresentar aumento de sintomas geniturinários como corrimento, uretrite e cervicite, ou podendo ser ainda assintomática. Os dados sugerem que este organismo contribui para alguns casos DIP, infertilidade e complicações na gravidez, podendo ser clinicamente não reconhecido devido aos sinais e sintomas brandos (HAGGERTY; TAYLOR, 2011; JENSEN, 2004; WEINSTEIN; STILES, 2011). Em mulheres, *M. genitalium* já foi detectado no endométrio de mulheres com DIP, nas tubas uterinas (ASHSHI et al., 2015; ROSS; JENSEN, 2006) e na cavidade abdominal (GRZESKO et al., 2009). Além disso, estudos sorológicos sugerem forte associação entre uma infecção passada por *M. genitalium* e infertilidade com fator tubário (ROSS; JENSEN, 2006).

2.1.2 *Mycoplasma hominis*

O primeiro relato do isolamento de micoplasma em humano foi em 1937. O microrganismo foi coletado em cultura pura, de um abscesso do ducto das glândulas de Bartholin. Na época, não havia sistema de identificação fenotípica das espécies de *Mycoplasma*. Contudo, acredita-se que tenha sido *M. hominis* pelo fato de os isolados descritos formarem colônias grandes e serem mais comumente encontradas no trato genital. As colônias de *M. hominis* em ágar apresentam a característica aparência de “ovo frito” com diâmetros de 0,2 a 0,3 µm (DIENES, 1939; DIENES; EDSALL, 1937).

M. hominis foi a denominação proposta para cepas que cresceram em meio semi-sólido, usualmente produzindo colônias granulares, com fraca e variável redução de azul de metileno e alcalinização do meio caldo. A ultraestrutura deste micoplasma apresentou membrana celular trilaminar, ribossomos, material nuclear, formação de filamentos curtos, ramificados, e espaçados indicando que sua reprodução ocorre por divisão binária. Contudo, embora seja comum as formas em divisão terem tamanhos iguais, as células filamentosas ocasionalmente atingem um comprimento até 30 µm, talvez em resposta às condições de crescimento abaixo do ideal (KRAUSE et al., 1982).

A falta de enzimas para a glicólise neste micoplasma indica baixa eficácia na obtenção de energia. Considera-se que *M. hominis* obtém ATP suficiente da hidrólise da arginina e não da uréia pela via dihidrolase envolvendo as enzimas arginina diaminase, ornitina carbamoiltransferase e carbamate kinase. Uma segunda via que envolve a geração de ATP a partir de ADP por meio de duas enzimas, fosfato acetiltransferase e acetato kinase, também foi proposta. Contudo, estudos mais recentes mostraram que a via não gerava como produto final AcetilCoA. De qualquer forma, a presença do gene que codifica a acetato kinase desempenha papel importante na produção de ATP em *M. hominis*. O microrganismo não produz fosfatase ou “filmes e manchas” no ágar, reduz o tetrazólio ou digere gelatina e caseína. A produção de peróxido por *M. hominis* é pequena, gerando apenas lise parcial de hemácias (alfa hemólise). Contudo, a produção de amônia faz elevar o pH do meio produzindo mudança da cor de amarelo para rosa. Além disso, colônias de *M. hominis* não são capazes de

realizar hemoadsorção (PEREYRE et al., 2009; TAYLOR-ROBINSON et al., 1981).

O genoma da cepa PG21 de *M. hominis* possui um único cromossomo circular com 665.445 bp com uma proporção de G + C de 27,1 %/mol. Contém 537 possíveis sequências de DNA codificante e 14 pseudogenes. Um pequeno, mas completo, conjunto de 33 genes de tRNA foi identificado. Não foram encontradas sequências de inserção, transposons ou plasmídios endógenos no genoma. Todavia, como o relato se baseou em uma cepa padrão, é válido registrar uma variação na proporção de G + C (27,3 a 33,7 %) e no tamanho do genoma (630 a 750 pb). Por este motivo, as cepas de *M. hominis* apresentam considerável polimorfismo demonstrando heterogeneidade (PEREYRE et al., 2009).

A patogênese de *M. hominis* envolve a adesão às células do hospedeiro com evidências de que proteínas de membrana são as responsáveis por esta função. Os danos provocados por enzimas de membrana como fosfolipase e aminopeptidase ou pela produção de amônia também são fatores que contribuem na patogênese. A colonização experimental do trato genital de camundongos por *M. hominis* foi dependente do tratamento hormonal, sendo recuperados os microrganismos da maioria dos animais tratados com estradiol quando comparado com o grupo não tratado. O tratamento com progesterona evidenciou proteção não sendo observada a colonização em animais tratados (TAYLOR-ROBINSON et al., 1981).

O fato de *M. hominis* ser considerado parte da microbiota do trato urogenital dificulta a compreensão do seu papel nas doenças. Por exemplo, não foi diretamente relacionado com eventos de aborto espontâneo (FARHADIFAR et al., 2016). Todavia, evidências indiretas refletem o seu potencial patogênico, como apresentado em diversos estudos. Embora *M. hominis* ocorra com frequência no trato geniturinário inferior, tem sido isolado do trato urogenital superior em pacientes com sintomas de infecção aguda e pielonefrite em humanos. Quando se verificou que *Gardnerella vaginalis* não era o único agente responsável pela vaginose bacteriana (VB), diversos pesquisadores começaram a investigar o possível papel de *M. hominis* (BACZYNSKA et al., 2007; GUPTA et al., 2009; GUVEN et al., 2007).

Atualmente, é aceita a participação de *M. hominis* na VB, mas o seu papel na doença ainda é desconhecido (COX et al., 2016). De maneira semelhante, também há dúvidas sobre sua associação com casos de doença inflamatória pélvica (DIP). Como existem indicações de que este tenha um papel patogênico primário em alguns casos de DIP aguda, parece razoável aceitar que atue de forma importante em casos de infertilidade relacionados à doença tubária. Contudo, esta participação ainda está pouco explicada. *M. hominis* também tem sido isolado do líquido amniótico de mulheres que apresentavam corioamnionite e subsequentemente abortaram, possibilitando, desta maneira, a associação deste micoplasma com estes eventos. (BACZYNSKA et al., 2007; GUPTA et al., 2009; GUVEN et al., 2007). Além destes, relato recente de detecção em amostras de tecido menstrual em mulheres gregas demonstra que a participação destes em casos de infertilidade merecem ser investigada (MICHOU et al., 2014).

2.1.3 *Ureaplasma* spp.

Os ureaplasmas são microrganismos pleomórficos, com morfologia que varia de acordo com a cepa, tempo de cultivo e método de observação. Desprovidos de sistema de motilidade, são bactérias microaerófilas com temperatura ótima de crescimento de 37 °C, mas podem crescer entre 22 °C e 42 °C. Em meio sólido, produzem colônias de 15 a 60 µm, em pH ideal de 6,0. Os ureaplasmas obtêm energia pela hidrólise da uréia. São encontrados com frequência no trato urogenital e respiratório de humanos e animais (BERGEY'S, 2010).

Ureaplasma urealyticum foi inicialmente dividido em dois biovars, com 14 sorovares. Em seguida, foi reclassificado como duas espécies distintas, *U. parvum* (biovar 1) e *U. urealyticum* (biovar 2). A proposta baseou-se no tamanho do genoma, nas sequências dos genes 16S rRNA, da região intergênica do 16S-23S rRNA, polimorfismos enzimáticos, hibridação DNA-DNA, crescimento diferencial em resposta ao manganês, subunidades do gene urease e região terminal 5' do antígeno múltiplas-bandas (MBA) (BLANCHARD, 1990; KONG et al., 2000; TENG et al., 1994). Assim, os sorovares foram divididos de modo que os tipos 1, 3, 6 e 14 foram relacionados à *U. parvum* e os sorovares, 2, 4, 5, 7,

8, 9, 10, 11, 12 e 13 à *U. urealyticum* (ABELE-HORN et al., 1996; ROBERTSON et al., 2002; XIAO et al., 2010).

Capazes de colonizar o trato urogenital de pessoas saudáveis, foram incluídos, anda assim, dentre os agentes infecciosos causadores de doenças urogenitais em humanos. Mesmo assim, a infecção e a distribuição destes microrganismos nos diferentes grupos populacionais podem variar em relação com vários fatores como idade, raça/cor, estado hormonal, bem como o número de parceiros sexuais da vida (ABELE-HORN et al., 1996; CORDOVA; CUNHA, 2002; POVLSEN; THORSEN; LIND, 2001; VERTERAMO et al., 2013).

O *U. parvum* é a espécie mais comumente isolada de amostras clínicas, especialmente em mulheres grávidas. *U. urealyticum* foi isolado com maior frequência em mulheres que tiveram parto prematuro com o diagnóstico clínico de VB, mulheres com aborto espontâneo e mulheres com DIP. Algumas amostras genitais podem conter cepas pertencentes a ambos os biovars (XIAO et al., 2011). O diagnóstico clínico da infecção genital por ureaplasma é complicado de ser estabelecido, uma vez que não existem sintomas característicos da infecção e por esses microrganismos geralmente não estarem envolvidos com patologias multicausais (WAITES et al., 2009).

As duas espécies de ureaplasma estão associadas a quadros de uretrite não-gonocócica e não-clamidal (BAKA et al., 2009), DIP, endometrite, infertilidade e às condições que podem afetar a gestação, o desenvolvimento do feto e do recém-nascido. Contribuem para o trabalho de parto prematuro, a corioamnionite espontânea, aborto espontâneo, prematuridade e baixo peso ao nascer. O recém-nascido exposto aos ureaplasmas pode desenvolver pneumonia, meningite, bacteremia, abscessos e displasia broncopulmonar (SUNG, 2010; XIAO et al., 2010).

Ureaplasmas podem ser isolados da superfície mucosa vaginal ou cérvix de 40 a 80% de mulheres saudáveis sexualmente ativas. A infecção é transmitida por contato sexual, ou pode ocorrer de forma vertical por passagem transplacentária, e no momento do parto (WAITES et al., 2009). Ureaplasma spp. já foram isolados de recém-nascidos de mães com membranas amnióticas íntegras e parto cesáreo, indicando transmissão transplacentária (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). A ocorrência no trato urogenital de homens saudáveis é de cerca de 20 a 29% (KONG et al., 2000; XIAO et al., 2010).

A amônia, liberada pela hidrólise da uréia, pela urease dos ureaplasmas, pode ser considerada um fator de virulência, que provavelmente interfere nos tecidos adjacentes aos ureaplasmas. Outro fator de virulência é a atividade de fosfolipase A1, A2 e C. Quando a infecção atinge a placenta, as fosfolipases disparam a produção de ácido araquidônico livre. Isto pode ativar a síntese de prostaglandinas e, possivelmente, induzir o parto prematuro (DE SILVA; QUINN, 1999).

O possível papel dos ureaplasmas nas doenças genitais em doenças do trato reprodutivo feminino, na gravidez ou causando infertilidade tem sido discutido desde 1970 e ainda não há justificativas claras para muitas perguntas. A associação inicial com a infertilidade ocorreu após o cultivo destas bactérias do trato genital inferior, mais comumente em casais inférteis. Estes achados não foram encontrados de forma consistente em investigações subsequentes. Culturas de tecido endometrial obtidos por laparoscopia também têm demonstrado que os ureaplasmas podem ser isolados, com maior frequência, de mulheres inférteis (WAITES et al., 2005).

2.2 Outros microrganismos de importância ginecológica

2.2.1 Papilomavírus humano (HPV)

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de DNA circular de duplo filamento e diâmetro variando de 52 - 55 nm. Com genoma é envolvido pelas histonas H2a, H2b, H3 e H4, forma complexo contido no capsídeo, o qual apresenta simetria icosaédrica composto por 72 capsômeros pentaméricos (BAKER et al., 1991; CHEN et al., 2000). O genoma possui oito fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs), divididas em precoces (E-early) e tardias (L-late), e uma região não codificadora LCR (*Long Control Region*), com elementos regulatórios e sítios de ligações para fatores de transcrição viral. As ORFs precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam proteínas não estruturais, e as tardias (L1 e L2) codificam as proteínas do capsídeo (FEHRMANN; LAIMINS, 2003).

Os HPVs podem ser classificados de acordo com sua capacidade de gerar neoplasias, enquadrando-se em HPV de baixo e alto risco oncogênico. Os de

baixo risco (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 55) estão relacionados com o desenvolvimento de verrugas e lesões de baixo grau. Os de alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) são associados com o câncer cervical (IARC, 2012).

O Dr. George Papanicolaou fez um dos primeiros relatos de lesões no colo do útero (THOMS, 1943). Ao longo dos anos, pesquisadores correlacionaram o aparecimento de lesões ao HPV e, atualmente, estudos epidemiológicos trazem evidências de que HPV é fator necessário mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical (INCA, 2014; MS/INCA, 2002). O câncer cervical é o sexto tipo mais comum de câncer na população e o segundo mais comum dentre as mulheres. No Brasil, estima-se que ocorram vinte mil novos casos de câncer cervical por ano (AYRES; SILVA, 2010).

O ciclo de infecção do HPV é dependente da diferenciação das células hospedeiras infectadas e da replicação das proteínas celulares (Figura 02) (GALLOWAY; LAIMINS, 2015). No ciclo de vida normal, as células filhas geradas na camada basal param de se dividir e se diferenciam, produzindo queratina. Nas camadas mais externas do epitélio, as células perdem a atividade metabólica. No caso das células da camada basal infectadas com HPV, a divisão celular não para devido à ação das proteínas virais para permitir a replicação viral (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). Quando as células epiteliais iniciam a diferenciação, a região promotora tardia do vírus é ativada levando à expressão de genes tardios. Esta cadeia de eventos permitem o aumento e replicação do genoma dos vírus. Por fim, nas camadas superiores, os genomas colocados nos capsídeos, finalizando a formação da partícula viral com potencial de infectar novas células (HEBNER; LAIMINS, 2006).

Figura 2 – Dependente ciclo de vida do Papilomavírus humano

Legenda: HPV estabelece infecção persistente nas camadas basais do epitélio celular. A replicação ou amplificação ocorre sob diferenciação nas camadas suprabasais.
 Fonte: Adaptado de Galloway e Laimins (2015).

A resposta imune adquirida é mediada pela combinação de mecanismos humorais (anticorpos) e celulares. A resposta imune celular é dependente e coordenada pela ação de diferentes citocinas como (Fator de Necrose Tumoral – alfa) TNF- α , (Interleucina 1) IL-1, IL-6, interferons, dentre outras, produzidas em diversas etapas. Essas citocinas podem ser liberadas por diversas células, como linfócitos T, macrófagos, mastócitos, queratinócitos e células *natural killers* (NK). A ação conjunta entre as citocinas bem como das células ativadas contribuem na contenção das infecções virais (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004). Neste contexto, TGF- β e TNF- α são potentes inibidores da proliferação de queratinócitos, desempenhando um papel importante no controle do crescimento dessas células. Além disso, TNF- α apresenta atividade antitumoral e antiproliferativa que pode ser um evento importante na regressão de lesões e tumores induzidos pela infecção persistente por HPV (KYO et al., 1994).

O HPV apresenta diferentes mecanismos de evasão da resposta imune. Intrinsecamente a intracelularidade viral dificulta a eficácia da resposta imune do hospedeiro. Isso torna-os inacessíveis às células do sistema imune. Assim, os anticorpos são importantes na resposta imune prévia, impedindo a entrada do vírus em novas células e na liberação de partículas das células já infectadas.

Como a infecção por HPV não apresenta característica citolíticas, não ocorre o recrutamento de resposta inflamatória satisfatória. Além deste mecanismo, proteínas do HPV podem desregular fatores relacionados à montagem da resposta imune. Isso pode ocorrer ao atuarem na maquinaria de processamento de peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) ou ainda, ao reprimir a expressão da cadeia pesada do MHC de classe 1, impedindo a resposta a resposta imune eficaz (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007). Por fim, HPV pode interferir nas atividades de IL-1 e IL-6, além da atividade antiproliferativa e antitumoral de TNF- α sendo esta uma peça chave na patogênese do vírus no câncer cervical (BOCCARDO et al., 2004; BOCCARDO et al., 2010).

2.2.2 *Neisseria gonorrhoeae*

O médico alemão Albert Neisser foi o primeiro a descrever a *N. gonorrhoeae* em 1879. Neisserias são cocos gram-negativos, aeróbios, com 0,6 a 1,0 μm de diâmetro e dispostas em pares (diplococos) com os lados adjacentes e achatados. São móveis, possuem pili, não formam esporos, são oxidase e catalase positivas. A espécie *N. gonorrhoeae* utiliza a glicose como fonte de carboidrato por meio da oxidação, exige meios complexos para o crescimento, sendo prejudicado pela exposição à baixa umidade e/ou a ácidos graxos. Todas as cepas de *N. gonorrhoeae* necessitam de cistina e fonte de energia (ex. glicose, piruvato ou lactato) para o crescimento. Muitas cepas necessitam da adição de suplementos como aminoácidos, purinas, pirimidinas e vitaminas. A temperatura ótima de crescimento é de 35 °C a 37 °C, sendo sensível a temperaturas mais baixas. Requer ou se beneficia de atmosfera úmida com 5% de CO₂ para o crescimento produzindo colônias de diferentes tamanhos, opacas ou transparentes. A natureza fastidiosa da espécie dificulta o isolamento em espécimes clínicos; no entanto, a bactéria é facilmente transmitida pelo contato sexual. *N. gonorrhoeae* apresenta diversos fatores de virulência como as proteínas de membrana externa Por, Opa e Rmp responsáveis por promover a sobrevivência, mediar adesão às célula do hospedeiro e proteger, indiretamente, de antígenos, de superfície respectivamente. A variação antigênica da pilina e diferenças antigênicas observadas na proteína PorB fazem com que o indivíduo

sofra reinfecções e inviabilizam o desenvolvimento de vacinas (BHALLA et al., 2007; BIGNELL; UNEMO; EUROPEAN, 2013; CHEN et al., 2013).

Neisseria gonorrhoeae, é o agente etiológico da gonorreia ou blenorragia em humanos, uma infecção sexualmente transmissível (IST) (WIESNER; THOMPSON, 1980). Pode ser transmitida por meio do sexo urogenital, anorretal ou oral desprotegido (KOEDIJK et al., 2012). Podem atacar as mucosas de sítios anatômicos como: trato geniturinário, olhos, reto e garganta, causando supuração aguda que pode levar à invasão tecidual. Em homens, geralmente ocorre uretrite, com pus de aspecto cremoso e amarelado, além de micção dolorosa, entretanto, a infecção uretral pode ser ainda assintomática. Em mulheres, a infecção primária é observada na endocérvice e estende-se à uretra e à vagina, resultando em corrimento mucopurulento. Pode ainda progredir para as tubas uterinas, causando salpingite, fibrose e obliteração das tubas. A oftalmia neonatal caracterizada por infecção ocular purulenta pode ocorrer em recém-nascido após o parto (ASHSHI et al., 2015; FASTRING et al., 2014; GUY et al., 2014).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 106 milhões de casos de gonorreia entre adultos em todo o mundo. Contudo, é válido ressaltar que em diversos países o número é subnotificado por não ser um agravo de notificação, como no Brasil (UNEMO; SHAFER, 2014). Atualmente, chama a atenção não apenas o número crescente de novos casos de gonorreia pelo mundo, mas também, o aumento da resistência antibiótica apresentada por estes (GRAD et al., 2016; UNEMO; SHAFER, 2014). Diante desta situação preocupante, planos de controle da disseminação e do impacto da resistência antibiótica tem sido proposto pela OMS (WORKOWSKI et al., 2015).

2.3 Endometriose

A endometriose é uma desordem ginecológica crônica comum, benigna, estrógeno-dependente e associada a dor pélvica e infertilidade (ACIEN; VELASCO, 2013; GIUDICE; KAO, 2004). É caracterizada pela presença de tecido endometrial fora do útero – principalmente no peritônio pélvico, mas também nos ovários e no septo retovaginal, e mais raramente no pericárdio, pleura e no cérebro (GIUDICE; KAO, 2004). Acomete aproximadamente 10-15%

das mulheres em idade reprodutiva e 30-50% das mulheres inférteis (ACIEN; VELASCO, 2013; ESKENAZI; WARNER, 1997).

A endometriose é responsável sozinha por mais de 100.000 hysterectomias por ano nos Estados Unidos. Os custos anuais em saúde atribuídos à doença chegam a mais de 1 bilhão de dólares por ano. Diante de tal cenário, a endometriose pode ser entendida como uma “doença social” pois afeta a qualidade de vida e a reprodução. Além disso, representa não apenas custos para o diagnóstico e o tratamento, mas também, por seu impacto socioeconômico ao diminuir a produtividade das pacientes (SIGNORILE; BALDI, 2010).

2.3.1 Quadro Clínico

O quadro clínico da paciente com endometriose é bastante variável. Algumas pacientes portadoras de endometriose podem ser assintomáticas, no entanto, a maioria apresenta queixas clínicas em diferentes intensidades, como dismenorreia, dor pélvica crônica, infertilidade, dispareunia de profundidade, sintomas intestinais e urinários cíclicos como dor ou sangramento ao evacuar/urinar durante o período menstrual e fadiga crônica (BELLELIS et al., 2010; NACUL; SPRITZER, 2010). Dentre outros fatores, a eventual inespecificidade do quadro clínico e a falta de correlação entre sintomas e gravidade da doença podem explicar a demora no diagnóstico da endometriose (BELLELIS et al., 2011). Relatos indicam que a demora no diagnóstico pode chegar, na média, a 11 anos devido, principalmente à variação dos sinais e sintomas e a confusão com outras desordens. Neste contexto, o padrão ouro para o diagnóstico da doença pélvica ainda é o procedimento cirúrgico - laparoscopia ou laparotomia (GIUDICE; KAO, 2004). Contudo, é válido ressaltar que Abrão et al., (2007), ao avaliarem a acurácia da ultrassonografia pélvica transvaginal, como método diagnóstico, demonstraram sensibilidade de 94% e especificidade de 98% na identificação de focos de endometriose profunda. Neste exame, se não forem observadas lesões, a paciente pode não ter endometriose ou ter doença inicial não-infiltrativa. Uma ferramenta útil para avaliar a severidade dos sintomas é a escala analógica visual da dor a qual é

graduada de zero a 10 para mensurar a dor referida nos sintomas mais comumente associados à endometriose (ACIEN; VELASCO, 2013).

2.3.2 Epidemiologia da Endometriose

Os avanços na epidemiologia da endometriose foram durante muito tempo mascarados por outras doenças e por problemas metodológicos relacionados à definição e seleção do grupo controle. Apesar disso, um perfil mais bem definido da epidemiologia tem emergido nas últimas décadas. Estima-se que a prevalência chegue a 10% na população em geral. Neste contexto, tem-se uma impressão clínica de que a raça/cor preta tem taxas menores de endometriose e os orientais (raça/cor amarela) tem taxas maiores que a raça/cor branca. Além destes, uma variedade de fatores de risco para endometriose tem sido descrita. Mulheres com endometriose podem ser mais altas e mais magras. Fatores menstruais podem incluir dismenorreia, menarca precoce (≤ 11 anos) e ciclos menstruais mais curtos (≤ 27 dias). Fatores ligados do estilo de vida, associados ao risco diminuído como o tabagismo e exercícios e associados ao risco aumentado como cafeína, etilismo, Índice de Massa Corporal (IMC). Por fim, a idade (> 30 anos), nuliparidade ou reduzida paridade e a história familiar como fatores de risco para a doença (ABRÃO et al., 2007; CRAMER; MISSMER, 2002; OZKAN; MURK; ARICI, 2008; PARAZZINI et al., 2016).

2.3.3 Classificação da endometriose

A endometriose pode ser classificada de acordo com o tipo histológico dos implantes, com a localização anatômica da doença – peritoneal, ovariana ou profunda – ou pela extensão da doença sobre os órgãos pélvicos. Além destas, a classificação mais utilizada atualmente é a da *American Society of Reproductive Medicine* (ASRM) – revisada em 1996. A classificação gradua a endometriose em mínima (Estádio I), leve (Estadio II), moderada (Estadio III) ou grave (Estadio IV) pela extensão da doença no peritônio e ovários, bem como pela presença de aderências tubo-ovarianas e bloqueio do fundo de saco de Douglas. Essa classificação, embora tenha limitações, é bastante útil na

orientação do tratamento pós-cirúrgico, especialmente quando a queixa da paciente é a infertilidade.

A classificação histológica da endometriose proposta por Abrão et al., (2003) baseia-se em quatro padrões morfológicos: (1) Padrão estromal: presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio tópico em qualquer fase do ciclo; (2) Padrão glandular bem diferenciado: presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, composto por células epiteliais com morfologia indistinguível dos endométrios tópicos nas diferentes fases do ciclo menstrual; (3) Padrão glandular indiferenciado: presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, sem características morfológicas vistas no epitélio endometrial tópico; (4) Padrão glandular misto de diferenciação: presença, na mesma localização, de epitélios com padrão bem diferenciado e indiferenciado (Figura 3).

Figura 3 – Padrões histológicos da endometriose

Legenda: **a.** Foco de endometriose estromal em meio fibrose (Hematoxilina eosina, HE – 100x); **b.** Foco de endometriose, padrões estromal e glandular bem diferenciado (HE – 400x); **c.** Endometriose de padrões estromal e glandular indiferenciado (HE – 400x); **d.** Endometriose de padrões estromal e glandular misto de diferenciação (HE – 100x).

Adaptado de: Podgaec, 2006

2.3.4 Teorias da Endometriose

Diferentes teorias têm sido propostas para explicar a endometriose. Dentre estas estão: (1) Teoria da metaplasia celômica (Teoria de Mayer); (2) Teoria da Implantação de Sampson (crescimento do endométrio após a menstruação retrógrada) e (3) Teoria da Indução. A teoria de Mayer propõe que a endometriose se estabeleça por meio da transformação celular hormônio-dependente das células peritoneais em células do tipo Mulleriano. De acordo com a teoria da implantação, no fenômeno da menstruação retrógrada o tecido endometrial fluiria através das tubas de falópio até alcançar a cavidade peritoneal. Ao alcançar este sítio anatômico o tecido endometrial pode se implantar e crescer. Finalmente, a teoria da indução é uma combinação das duas primeiras teorias e propõe que fatores biomecânicos e imunológicos induzem células indiferenciadas para diferenciadas em tecido endometrial (AUGOULEA et al., 2012; SAMPSON, 1927; VINATIER et al., 2001).

Neste contexto, a teoria da menstruação retrógrada (Teoria de Sampson) é a mais aceita para explicar a patogênese da endometriose (SIGNORILE; BALDI, 2010). Diversos pontos argumentam a favor desta teoria: (1) o refluxo de células endometriais durante a menstruação é um fenômeno quase universal quando as tubas uterinas são saudáveis; (2) a localização das lesões de endometriose ocorrem na maioria das vezes próximos da extremidade das tubas uterinas; (3) As células endometriais expressam adesinas e integrinas em sua superfície permitindo sua adesão ao peritônio; (4) o endométrio produz fatores angiogênicos essenciais para a neovascularização local (VINATIER et al., 2001). Contudo, é possível afirmar que a endometriose é uma doença multifatorial com características multifacetadas e, portanto, todas as teorias sobre a sua patogenia devem ser complementares uma à outra, não sendo mutuamente exclusivas (BELLELIS et al., 2011; SIGNORILE; BALDI, 2010). Diferentes aspectos da doença continuam sendo alvo de pesquisa, destacando-se a busca pela etiopatogenia, tendo em vista que ao se entender o motivo do desenvolvimento do foco de endometriose seria possível direcionar esforços para melhorar o diagnóstico e tratamento (BELLELIS et al., 2011; SIGNORILE; BALDI, 2010).

2.3.5 Sistema imune e endometriose

A teoria da menstruação retrógrada explica a maior parte dos fenômenos associados à patogênese da doença. Contudo, se este é um fenômeno comum e que ocorre na maior parte das mulheres por que apenas cerca de 10% desenvolve a doença? Duas hipóteses para a progressão da doença foram postuladas: (1) Anomalias intrínsecas do endométrio eutópico desenvolve resistência à eliminação pelas células imunes peritoneais e (2) a doença é uma consequência da função alterada de macrófagos e células *natural killer* (NK), as quais são incapazes de eliminar os implantes endometrióticos. A relação entre estas duas hipóteses não está clara; estas são provavelmente interdependentes (ACIEN; VELASCO, 2013; KRALICKOVA; VETVICKA, 2015).

O sistema imune pode desempenhar papel importante na iniciação e progressão da doença. Em particular, linfócitos T e B e células *Natural Killer* (NK) parecem desempenhar um papel essencial na rejeição ou não do processo de sobrevivência, implantação, e proliferação do endométrio ectópico (OLOVSSON, 2011). Estudos têm mostrado uma atividade reduzida de células T CD8+ e NK, secreção de citocinas por células T auxiliares, e produção de auto-anticorpos por linfócitos B em mulheres com endometriose (BERBIC; FRASER, 2011; OSUGA et al., 2011; SIKORA; MIELCZAREK-PALACZ; KONDERA-ANASZ, 2011). Contudo, em outro estudo recente realizado por Dias et al., (2012) com mulheres brasileiras, foi observada alta porcentagem de células NK no sangue periférico com endometriose profunda (estágios III e IV), ampliando o debate sobre o assunto quando em discordância com outros dados da literatura. Além disto, tem sido demonstrado que as interações imuno-endócrinas dos indivíduos podem estar envolvidas na patogênese da endometriose (OLOVSSON, 2011).

Neste contexto, a maioria dos estudos indicam que as células NK periféricas e as não periféricas apresentam baixa citotoxicidade nas mulheres com endometriose. Estas células aumentam a expressão de receptores inibidores de morte. Estes receptores interagem com HLA-1 de potenciais células-alvo e sofrem a supressão de sua atividade. A atividade dos linfócitos T também está diminuída devido a ativação dos mecanismos de apoptose via Fas-FasL expresso por células endometrióticas e o alto nível da mesma molécula na forma solúvel (HERINGTON et al., 2011).

Com a função celular do sistema imune deficiente, a produção de citocinas e quimiocinas por diferentes células podem favorecer a progressão da doença em detrimento da prevenção. Neste contexto, IL-1 apresenta resultados conflitantes quando comparados grupos com e sem endometriose. IL-6, por sua vez, pode estar aumentada no soro e ser produzida por células estromais do endométrio em resposta a hormônios e a ativadores imune como IL-1 α ou β , TNF- α ou β e IFN- γ . A Interleucina 8 (IL-8) pode desempenhar papel crucial no crescimento da endometriose por ser uma potente angiogênica. MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Agent*) é produzida por várias células e estimula macrófagos maduros a secretarem fatores de crescimento e citocinas que promovem a proliferação de células endometriais. A MCP-1 apresenta alta concentração no fluido peritoneal e está relacionada com a severidade da doença. RANTES, potente quimioatratador para monócitos, macrófagos e linfócitos T, *in vitro*, foi secretado em maior quantidade por endometriomas quando comparado a células normais do endométrio. Alguns autores têm demonstrado que TNF- α tem concentrações elevadas no soro e no fluido peritoneal de paciente com EDT e que as concentrações encontradas se correlacionam com a severidade da doença (HERINGTON et al., 2011).

Citocinas, como IL-12 podem apresentar-se em níveis elevados no líquido peritoneal de pacientes com endometriose em estágios mais avançados, quando comparado com mulheres em estágios iniciais. Isto sugere uma modulação do perfil Th1 de resposta imunológica, ou seja, pode interferir diretamente no desenvolvimento da endometriose (FAIRBANKS et al., 2009). Outros trabalhos sugerem que quando dados clínicos específicos associam-se a uma produção elevada de certas citocinas, ocorre um padrão de resposta Th1 que pode estar associado à endometriose profunda (PODGAEC et al., 2010). Contudo, apesar da predominância de um perfil de resposta celular Th1, existem indícios da mudança de perfil para uma resposta humoral devido uma alta produção de citocinas do perfil Th2 em mulheres com endometriose (PODGAEC et al., 2007).

2.3.6 Microrganismos patogênicos e endometriose

Crescente número de evidências sugere que fatores genéticos e de estilo de vida, exposições ambientais, idade, dentre outras características podem ter

um papel importante nos mecanismos etiopatogênicos da endometriose (OZKAN et al., 2008). Embora 70 a 90% das mulheres apresentem menstruação retrógrada, apenas uma minoria irá desenvolver a doença. Isso sugere que outros fatores – genéticos, hormonais ou ambientais – poderiam determinar uma maior suscetibilidade para desenvolver a doença (BELLELIS et al., 2011; STEFANSSON et al., 2002).

Recentemente, tem aumentado o interesse de diferentes pesquisadores em explorar a relação entre a patogênese da endometriose e a possível participação de microrganismos neste complexo processo (KHAN et al., 2010; KHAN et al., 2014; KHAN et al., 2015; KHAN et al., 2016; KOBAYASHI et al., 2014). Nos últimos anos, hipóteses que propõe uma teoria infecciosa como fator associado à etiopatogênese da endometriose foram propostas. O primeiro trabalho a sugerir tal relação foi publicado por Kodati et al., (2008). Neste estudo, os autores isolaram RNAm de tecidos eutópicos e ectópicos de casos confirmados de endometriose. Realizaram então PCR por transcriptase reversa utilizando sete diferentes conjuntos de primers arbitrários e obtiveram ao final apenas uma única banda em tecido endometriótico eutópico. Após sequenciamento, o material foi colocado na plataforma BLAST e a sequência encontrada revelou uma região de 60/65pb correspondendo a 96% de homologia com DNA de *Shigella*. Com o resultado os autores sugeriram nova possibilidade para a etiologia da endometriose. Neste caso, a bactéria não-móvel passaria entre as células do cólon por meio do mecanismo único chamado polimerização F-actina, alcançando a lâmina própria da mucosa do cólon. Os autores cogitaram que pelo mesmo mecanismo a bactéria possa chegar à corrente sanguínea ou ainda percorrer através da parede do cólon e, assim, alcançar a superfície peritoneal externa do cólon, a qual está em proximidade com o fundo de saco de Douglas. Os autores também propuseram que a reação peritoneal a esta invasão bacteriana possa ser similar a qualquer resposta antigênica do sistema imune do hospedeiro. O resultado deste processo seria a ativação de macrófagos e produção de citocinas características da resposta à inflamação aguda. As células endometriais que são extravasadas durante a menstruação retrógrada no fundo de saco de Douglas adeririam à superfície peritoneal e ovariana sob influência dos hormônios circulantes, progredindo para endometriose por meio da angiogênese. Por fim, os autores postulam que *Shigella* ou microrganismos

similares a *Shigella* possam ser o gatilho para as mudanças imunológicas no peritônio pélvico as quais iniciam a etiogênese da endometriose.

Além da já conhecida teoria da implantação descrita por Sampson, Vestergaard et al., (2010) também sugeriram que fatores adicionais que aumentem a susceptibilidade à endometriose devam existir e, neste contexto, fatores imunológicos isolados ou em associação com infecção viral possam estar envolvidos. Os autores analisaram a prevalência de HPV em 52 mulheres. Destas, no grupo caso (n =32) foram incluídas mulheres com endometriose (lesões eutópicas e ectópicas). No grupo controle (n =20), mulheres sem endometriose e que fizeram histerectomia. Esfregaços do colo do útero de ambos os grupos e amostras de tecido ectópico e eutópico foram analisados para a presença de HPV por meio da PCR convencional. Os autores observaram que 3% das mulheres com endometriose foram PCR-positiva para HPV e que 10% das mulheres sem endometriose foram PCR-positivas para HPV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0.33$). O uso da PCR convencional para detecção do HPV pode ter contribuído para a baixa prevalência encontrada o que certamente compromete uma análise mais consistente.

Outro microrganismo de interesse genital também tem sido relacionado com endometriose seria a *C. trachomatis*. Gazvani et al., (2011) citando dados de trabalho próprio, ainda não publicado, reportaram alta prevalência de anticorpos no líquido intraperitoneal e no soro para *C. trachomatis* em mulheres com endometriose (38%) quando comparado com controles (19%). Baseado nesta observação, estes autores lançaram a hipótese de que a *C. trachomatis* poderia estar envolvida na patogênese da endometriose. Estes autores acreditam que a presença da *C. trachomatis*, ao induzir uma resposta inflamatória no hospedeiro, poderia gerar um ambiente favorável à gênese da endometriose, se não em todos, pelo menos em alguns casos.

Os trabalhos realizados por Gazvani et al., (2011), Kodati et al., (2008) e Vestergaard et al., (2010), apesar de introduzirem a problemática, não oferecem bases mais sólidas de observação. Sobretudo pois não são encontradas continuidades dos trabalhos na literatura. Nesse contexto, os trabalhos publicados nos últimos 6 anos por Khan et al., (2010); Khan et al., (2014); Khan et al., (2015) e Khan et al., (2016) demonstram de forma mais consistente o

propósito de se avaliar quais as implicações provocadas pelos microrganismos no contexto da endometriose.

O trato genital inferior está exposto à colonização por vários microrganismos, os quais podem ascender e infectar o trato genital superior por meio da migração (DEB et al., 2004; LARSEN; GALASK, 1980; WIRA et al., 2005). Com base nesta ideia a “teoria da contaminação bacteriana ou infecciosa” emergiu propondo que a ativação bacteriana via LPS/TLR-4 podem levar à inflamação pélvica em endometriose, aumentando lesões e sintomas (KHAN et al., 2010). Neste trabalho, estes autores encontraram altas concentrações de *Escherichia coli*, *Gardnerella* sp., alpha-*Streptococcus* e *Enterococci* em amostras de endométrio de mulheres com endometriose, e subsequente alto nível de endotoxina.

Em outro estudo, Khan et al., (2014) avaliaram o risco colonização intrauterina e concorrente ocorrência de endometrite em mulheres com endometriose. Amostras de muco vaginal e endométrio foram coletadas de mulheres com e sem endometriose. Foi observado aumento da colonização intrauterina e concorrente endometrite em mulheres com endometriose, sendo ainda maior naquelas mulheres que foram tratadas previamente com agonista de GnRH (GnRHa). Os achados sugerem uma alta propensão à endometrite após o tratamento hormonal, bem como uma infecção subclínica.

Neste contexto, em seu trabalho mais recente, Khan et al., (2016) reforçam o argumento de que microrganismos presentes na cavidade uterina podem levar a uma infecção subclínica no ambiente intrauterino e no endometriomas de ovário. Estes autores propõem como possível explicação para seus achados que a menstruação retrógrada seja o fenômeno que permitiu carrear microrganismos até os ovários.

Microrganismos intrauterinos podem ser críticos na iniciação da endometriose. A ativação inicial dos receptores de reconhecimento de patógenos (RRP) por estímulo microbiano resulta na ativação de vias pró-inflamatórias e da imunidade inata. Somado à resposta a vários padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os receptores *Toll-like* também reconhecem um amplo leque de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). A expressão aumentada dos níveis de DAMPs pode estar envolvido em um subsequente processo de transcrição nuclear dependente do fator- $\kappa\beta$ (KOBAYASHI et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Detectar a presença de *Mollicutes* (*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum*), Papilomavírus humano (HPV) e *N. gonorrhoeae* em amostras de *swab* endocervical, fluido peritoneal e biópsia de lesão de endometriose de mulheres com endometriose e de peritônio pélvico sadio de mulheres sem endometriose para avaliar a associação entre a presença destes agentes infecciosos e a endometriose.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar, por meio de método molecular (PCR e qPCR), *Mollicutes* (*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum*) HPV e *N. gonorrhoeae* em amostras de *swab* endocervical, fluido peritoneal e biópsia de lesão de endometriose de mulheres com endometriose e de peritônio pélvico sadio de mulheres sem endometriose;
- Avaliar se os *Mollicutes* (*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum*) HPV e *N. gonorrhoeae* detectados nas amostras de *swab* endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia têm associação com perfil clínico-demográfico observado na população estudada;
- Avaliar se citocinas do perfil Th1/Th2/Th17/Th22 dosadas em amostras de fluido peritoneal e tecido de biópsia apresentam perfil alterado devido à endometriose e/ou associado à presença de *Mollicutes*.
- Analisar o perfil de expressão gênica, por meio da qPCR *array*, de vias de resposta imune em amostras de fluido peritoneal e de biópsia de lesão de mulheres com e sem endometriose, infectado ou não pelos microrganismos estudados;

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

4.1.1 Locais do estudo e pacientes

O estudo foi desenvolvido no Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e no Hospital Sírio-Libanês (São Paulo). De agosto de 2014 a agosto de 2015, foram incluídas no estudo 104 pacientes de forma prospectiva, e que foram divididas em dois grupos: Grupo Caso (n = 73), constituído de pacientes com endometriose e Grupo Controle (n = 31), formado por mulheres sem a doença. O total de paciente foi determinado baseando-se, em um cálculo amostral, onde foram considerados os seguintes parâmetros: a) prevalência em dados, de estudo piloto, relacionando colonização de micoplasmas em mulheres com endometriose; b) precisão de 5%; c) nível confiança de 95%; e d) 10% de perdas. Além disso, a obtenção de dados e material clínico esteve condicionado à demanda e rotina de atendimento das duas unidades hospitalares e equipes médicas responsáveis. As atividades desenvolvidas nos hospitais junto às equipes de saúde foram conduzidas sob supervisão do Prof. Dr. Maurício Simões Abrão. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas conforme parecer nº 1170/CEPESH (Anexo A), do Hospital Sírio-Libanês conforme Registro AVAP nº GBC260 (Anexo B) e registrado na Plataforma Brasil conforme parecer nº 550.484 (Anexo C). Todas as pacientes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo D). O tipo de cirurgia realizado por cada paciente está sumarizado no Apêndice A.

4.1.2 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão do Grupo Caso (com endometriose) foram: Comprovação histológica da endometriose; Ausência de doenças neoplásicas concomitantes, no momento do diagnóstico histológico de endometriose, constatada pela anamnese, exame físico, inspeção cirúrgica e exames

subsidiários, quando necessários; Ausência de doenças autoimunes, confirmada por anamnese, exame físico e por exames laboratoriais quando necessário clínicos e exames laboratoriais sugestivos de doença autoimune; Pacientes deveriam estar no período da menacme; Pacientes que não tivessem utilizado antibioticoterapia até um mês antes da coleta do material.

Para o grupo controle, foram adotados os seguintes critérios de inclusão: Comprovação cirúrgica da ausência de lesões de endometriose; Ausência de doenças neoplásicas, diagnóstico negativo para endometriose constatada pela anamnese, exame físico, inspeção cirúrgica e exames subsidiários, quando necessários; Ausência de sinais clínicos e exames laboratoriais sugestivos de doença autoimune; Pacientes deveriam estar no período da menacme; Pacientes com indicação de cirurgia por videolaparoscopia; Pacientes que não tivessem utilizado antibioticoterapia até um mês antes da coleta do material.

4.1.3 Quadro clínico

Todas as pacientes foram questionadas quanto à presença de seis sintomas associados à endometriose, sendo estes:

- a. Dismenorreia: dor em cólica no período menstrual, considerada para o estudo somente de intensidade severa, quando a paciente referia que a dor não melhorava completamente com analgésicos, mas não a impedia de exercer suas atividades habituais ou incapacidade, quando a paciente referia que a dor a impedia de exercer suas atividades habituais (LAUFER; GOLDSTEIN, 1998);
- b. Dispareunia de profundidade: dor pélvica durante a relação sexual;
- c. Dor pélvica acíclica: dor pélvica sem relação com o ciclo menstrual por menos de seis meses, sem melhora com a utilização de analgésicos;
- d. Infertilidade: dificuldade para engravidar em casal com vida sexual ativa (duas ou mais relações sexuais por semana) e sem utilizar método contraceptivo por pelo menos um ano;
- e. Alterações intestinais cíclicas: sintomas intestinais durante o período menstrual, incluindo aceleração ou diminuição do trânsito intestinal, dor à evacuação, puxo, tenesmo e/ou sangramento nas fezes.
- f. Alterações urinárias cíclicas: sintomas urinários durante o período menstrual, incluindo disúria, hematúria, polaciúria e/ou urgência miccional.

Todos os quadros álgicos tiveram sua intensidade avaliada de acordo com a escala analógica da dor (EAD) (Anexo E). As notas da EAD de 1 a 6 (< 7) foram consideradas para dores leves ou moderadas e as notas de 7 a 10 (≥ 7) para dores severas (CHAPRON et al., 2012). Além disso, questionários para avaliação de características demográficas, hábitos e características clínicas foram aplicados a cada paciente (Apêndice B e Anexo F).

4.1.4 Estadiamento da Endometriose

As pacientes com endometriose tiveram sua doença classificada durante o procedimento cirúrgico pelos critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM), revisado em 1996 (Figura 4), em estádios de I a IV.

Figura 4 – Estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine - ASRM* (1996).

Estádio I (mínima): 1 – 5 pontos		Estádio III (moderada): 16 – 40 pontos		
Estádio II (leve): 6 – 15 pontos		Estádio IV (severa): > 40 pontos		
PERITÔNIO	ENDOMETRIOSE	< 1 cm	1 – 3 cm	> 3 cm
	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
OVÁRIO	D Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
	E superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE SACÓ POSTERIOR		Parcial		Completa
		4		20
OVÁRIO	ADERÊNCIAS	< 1/3 Envolvido	1/3 - 2/3 Envolvidos	> 2/3 Envolvidos
	D Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
	E Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
TROMPA	D Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16
	E Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16

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

Porcentagem de implantes:

Lesões vermelhas (claras, vermelhas, rosadas, em chama, vesículas): ____%

Lesões brancas (brancas, amareladas, marrons, defeitos de peritônio): ____%

Lesões pretas (pretas, depósitos de hemossiderina, azuis): ____%

Endometriose adicional: _____

Patologias associadas: _____

4.1.5 Locais da doença

As lesões de endometriose foram também avaliadas quanto ao sítio mais severo de endometriose peritônio, ovário e/ou em localização infiltrativa profunda, que inclui região retrocervical, vagina, reto-sigmoide, íleo, apêndice, ureter e bexiga. Os locais de comprometimento foram considerados observando-se critérios de severidade do processo, ou seja, doença profunda mais grave que a ovariana, que por sua vez é mais grave que a doença peritoneal. Assim, foram atribuídos como critérios para se considerar doença peritoneal, a existência de focos peritoneais exclusivos, sem a presença de doença profunda e em ovários. A doença ovariana foi determinada na ausência da doença profunda, independente de focos peritoneais. Para a doença profunda, não houve restrições pela presença de endometriose peritoneal ou ovariana.

4.2 Coleta de amostras e processamento em laboratório

4.2.1 Swab endocervical

Para obtenção de swab endocervical de cada paciente, foram utilizados espéculos estéreis de forma asséptica. Durante a coleta evitou-se a fricção do swab no introito vaginal. Os swabs foram acondicionados em 5 mL de meio de transporte (BUSOLO et al., 1981) e mantidos sob refrigeração (4 °C) até o processamento em laboratório. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex (15 segundos), divididas em alíquotas (1 mL) em microtubos e, por fim, armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o momento do uso.

4.2.2 Fluido Peritoneal

O fluido intraperitoneal foi colhido no início da cirurgia laparoscópica do fundo do saco de Douglas e de outras regiões do assoalho pélvico. De forma asséptica, as amostras foram imediatamente aliquoteadas em microtubos estéreis de criopreservação, prontamente armazenados em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas congeladas até o processamento em laboratório. No

laboratório, as amostras de fluido peritoneal foram processadas e armazenadas de acordo com a sua finalidade. A alíquota destinada aos testes de detecção de microrganismos por meio da PCR quantitativa em tempo real foi armazenada a - 80 °C até o momento do uso. A alíquota destinada à dosagem de citocinas foi, inicialmente, centrifugada a 20 600 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi acondicionado em novos microtubos estéreis até o uso. O *pellet* obtido na centrifugação, por sua vez, foi homogeneizado em 1 mL com solução tampão estéril RNA Later® (Ambion, Inc., Austin, TX) e armazenado até o uso para análises de expressão gênica.

4.2.4 Lesão de Endometriose

As amostras de lesão de endometriose (peritoneal, ovariana ou profunda) ou peritônio sadio foram acondicionadas em microtubos estéreis de criopreservação imediatamente após a remoção cirúrgica, ainda na sala de cirurgia. Antes de serem armazenados, os tecidos foram divididos de forma asséptica em três partes. As partes, armazenadas separadamente, foram acondicionadas em nitrogênio líquido até processamento. No laboratório, as amostras destinadas a dosagem de citocinas foram maceradas em tampão inibidor de protease (20 mM Tris-HCl, 150 µM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton, 1 µg/mL pepstatina, 1 mM PMSF – pH 7,5) centrifugada a 20 600 x g por 5 minutos e colhido o sobrenadante. As amostras destinadas à análise de expressão gênica foram conservadas em tampão RNA later (Ambion, Inc., Austin, TX). As amostras destinadas à detecção de microrganismos por PCR em tempo real foram conservadas igualmente em tampão RNA later até o uso. Todas as amostras foram armazenadas em freezer (- 80 °C) até o momento do uso.

4.3 Padronização das cepas utilizadas

Para controle positivo dos testes moleculares, foram cultivadas quatro cepas de micoplasmas (*M. hominis* ATCC 23114 - PG-21, *M. genitalium* ATCC 33530 - G37, *U. urealyticum* T960 - sorotipo 7 e *U. parvum* ATCC - sorotipo 3). As cepas foram obtidas do Laboratório de Micoplasmas ICB/USP. Os meios de cultivo SP4 (TULLY, 1993) e UB (RUHNKE; ROSENDAL, 1994) foram utilizados

nos subcultivos das cepas de referência de *Mycoplasma spp.* e *Ureaplasma spp.* respectivamente. Os microrganismos foram subcultivados inoculando-se em meios sólidos e líquidos (50 mL), incubados a 37 °C em condições de aerobiose. O controle do crescimento foi realizado pela observação de mudança de cor no meio líquido, acrescido de indicador de pH (vermelho de fenol), resultante da hidrólise da arginina ou fermentação da glicose. No meio sólido, observou-se a produção de pequenas colônias em forma de “ovo frito”.

4.4 Extração de DNA

O DNA genômico das cepas de referência e das amostras de *swab* endocervical, fluido peritoneal e lesão de endometriose foram obtidas segundo protocolo do *kit* Invitrogen Purelink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), baseado na utilização de coluna de sílica.

4.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

4.5.1 Reação de controle interno da qualidade do DNA

Foi realizada PCR utilizando *primers* G73/G74 para o gene β -globina, utilizado como controle interno da qualidade do DNA extraído (CAMPOS et al., 2008). Os parâmetros da reação foram 1x de buffer; 0,2 mM de dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, 0,08 μM dos *primers* G73 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3'); 0,5 U de Taq DNA polimerase recombinante, todos da Invitrogen® (São Paulo, S.P., Brasil); 6 μL de DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 25 μL . As amplificações foram realizadas em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, um ciclo final de 72 °C por 5 minutos e *hold step* a 4 °C. A corrida foi feita em gel de Agarose 1% corado com 0,3% de Gel Red™ (Biotium®) (CAMPOS et al., 2008). Todas as amostras foram positivas, apresentando boa qualidade para a realização das próximas PCRs.

4.5.2 qPCR para detecção de *M. genitalium*

Para realização da PCR em tempo real para detecção da espécie *M. genitalium* nas amostras clínicas foram utilizadas placas de 96 poços próprias para realização da técnica, adicionado a cada poço (0,2 mL): 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems São Paulo, S.P., Brasil), 2,5 µL de *primer* MgPa-355F (5'-GAGAAATACCTTGATGGTCAGCAA-3') [10 pmols], 2,5 µL de *primer* MgPa-432R (5' – GTTAATATCATATAAAGCTCTACCGTTGTTATC – 3') [10 pmols], 0,5 µL de sonda (5' FAM – ACTTTGCAATCAGAAGGT – MGB 3') [5 mM], 2 µL de água e 5,0 µL de DNA, com volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas à amplificação nas seguintes condições de termociclagem: 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (OLSEN et al., 2009). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata, utilizando a plataforma Applied Biosystems.

4.5.3 qPCR para a detecção de *M. hominis*

Na realização da PCR em tempo real para detecção da espécie *M. hominis* foram utilizadas placas próprias para realização da técnica, adicionado a cada poço (0,2 mL): 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, S.P., Brasil), 0,6 µL de *primer* MHyidCfwd (5' – TCACTAAACCGGGTATTTTCTAACAA – 3') [10 pmols], 0,6 µL de *primer* MHyidCrev (5' – TTGGCATATATTGCGATAGTGCTT – 3') [10 pmols], 0,8 µL de sonda (5' FAM – CTACCAATAATTTTAATATCTGTCTGGTATG – MGB 3') [5 mM], 8,5 µL de água e 2 µL de DNA, com volume final da reação de 25 µL. As amostras foram submetidas à amplificação nas seguintes condições de termociclagem: 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (FERANDON et al., 2011). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata, utilizando a plataforma Applied Biosystems.

4.5.4 qPCR para detecção de *U. urealyticum*

Na realização da PCR em tempo real para detecção da espécie *U. urealyticum* foram utilizadas placas próprias para realização da técnica, adicionado a cada poço (0,2 mL): 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, S.P., Brasil), 0,75 µL de *primer* UUureF (5' – ATCGACGTTGCCCAAGGGGA – 3'), 0,75 µL de *primer* UUureR (5' – TTAGCACCAACATAAGGAGCTAAATC – 3') [10 pmols], 0,5 µL de sonda (FAM – TTGTCCGCCTTTACGAG – MGB) [5 mM], 9,5 µL de água e 1,0 µL de DNA em quantidades suficientes para um volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas à amplificação nas seguintes condições de termociclagem: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 58 °C por 30 segundos (CAO et al., 2007). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata, utilizando a plataforma Applied Biosystems.

4.5.5 qPCR para detecção de *U. parvum*

Na realização da PCR em tempo real para detecção da espécie *U. urealyticum* foram utilizadas placas próprias para realização da técnica, adicionado a cada poço (0,2 mL): 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, S.P., Brasil), 0,75 µL de *primer* UUUrePF (5' – CATTGATGTTGCACAAGGAGAAA – 3'), 0,75 µL de *primer* UUUrePR (5' – TTAGCACCAACATAAGGAGCTAAATC – 3') [10 pmol], 0,5 µL de sonda (FAM – TTGACCACCCTTACGAG – MGB) [5 mM], 9,5 µL de água e 1,0 µL de DNA em quantidades suficientes para um volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas à amplificação nas seguintes condições de termociclagem: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 58 °C por 30 segundos (CAO et al., 2007). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata, utilizando a plataforma Applied Biosystems.

4.5.6 qPCR para detecção de *N. gonorrhoeae*

Na realização da PCR em tempo real para detecção da espécie *N. gonorrhoeae* foram utilizadas placas próprias para realização da técnica,

adicionado a cada poço (0,2 mL): 12,5 µL de Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, S.P., Brasil), 0,75 µL de *primer* NGF (5' - CCGGAAGTGGTTTCATCTGATT - 3'), 0,75 µL de *primer* NGR (5' - GTTTCAGCGGCAGCATTCA - 3') [10 pmol], 0,5 µL de sonda (FAM - CGTGAAAGTAGCAGGCGTATAGGCGGACTT - MGB) [5 mM], 9,5 µL de água e 1,0 µL de DNA em quantidades suficientes para um volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas à amplificação nas seguintes condições de termociclagem: 50 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 55 °C por 30 segundos (GEELEN et al., 2013). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata, utilizando a plataforma Applied Biosystems.

4.5.7 Análise dos dados da PCR quantitativa

A quantificação dos microrganismos foi realizada por meio de técnica de quantificação absoluta, tomando por base uma curva padrão, previamente estabelecida, variando de 10^7 a 1 cópias de microrganismos/mL. Para cada experimento, uma nova curva padrão foi adicionada e parâmetros de qualidade foram adotados na análise, sendo estes: $r^2 \geq 0.950$, eficiência da reação variando de 95% a 105% e *slope* de valor ≈ -3.32 .

4.5.8 PCR para detecção de Papilomavírus humano (HPV)

Para detecção de HPV foi realizada PCR utilizando 1x de tampão; 0,2 mM de dNTP; 4 mM de $MgCl_2$; 1 µM dos *primers* GP5 (5' - TTTGTTACTGTGGTAGATAC - 3') e GP6 (5' - GAAAAATAAACTGTAAATCAT - 3'); 0,5 U de Taq DNA polimerase recombinante, todos da Invitrogen® (São Paulo, S.P., Brasil); 3 µL do DNA e quantidade suficiente de água ultrapura até o volume final de 25 µL. Após adição do DNA, as amostras foram levadas para o termociclador sob o programa de 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, 39 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 40 °C por 2 minutos, 72 °C por 1,5 minuto, e um ciclo final a 72 °C por 7 minutos. A corrida foi feita em gel de Agarose 1% corado com 0,3% de Gel Red™ (Biotium®) (GRAVITT et al., 2000; SNIJDERS et al., 1990).

4.6 Dosagem de citocinas

A dosagem das citocinas, presentes das amostras de líquido intraperitoneal e amostras de lesão de endometriose (peritoneal, ovariana ou profunda) ou peritônio sadio, foi realizada por meio do ensaio para detecção por meio da tecnologia para bioensaios multiplex–Luminex com equipamento Bio-Plex 200 system. Foi utilizado o Kit comercial ProcartaPlex® Immunoassay Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh/Treg (18 plex) (eBioscience – Affmetrix, Estados Unidos) para determinação de GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e TNF- α . Ensaio Luminex são baseados na tecnologia xMAP® a qual possibilita a detecção e quantificação de múltiplos alvos de proteínas simultaneamente. O sistema xMAP® combina um citômetro de fluxo, microesferas fluorescentes, lasers e um processamento de sinal digital para permitir a multiplexação eficiente de até 100 ensaios exclusivos em uma única amostra. As dosagens das citocinas foram realizadas de acordo com o fabricante do kit utilizado. Para a normalização dos dados de citocinas, a quantidade obtida foi correlacionada com a quantidade de proteína total das amostras. A dosagem de proteínas totais foi realizada utilizando o kit Pierce BCA *Protein Assay* (Thermo Scientific, Brasil)

4.7 Análise de expressão gênica

A expressão gênica dos marcadores inflamatórios foi avaliada pela metodologia de PCR *array*. O mRNA, das células presentes no líquido intraperitoneal e das amostras de lesão de endometriose (peritoneal, ovariana ou profunda) ou peritônio sadio, foi extraído com a utilização do kit TRIZOL® Plus (Thermo Scientific, Brasil), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A obtenção do cDNA foi feita por meio de uma retro-transcrição (RT) a partir do mRNA, utilizando-se o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Brasil) com adição de oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm (Oligo dT) e inibidor de RNase. O cDNA obtido foi submetido a análise pelo kit *Human Innate & Adaptive Immune Responses PCR Array* (Qiagen-SABioscience, Brasil). O kit de qPCR *array* permite analisar a expressão de 84 genes envolvidos na resposta do hospedeiro à infecção bacteriana (Tabela

1). Esse *array* inclui genes relacionados a sinalização de TLR, bem como, genes envolvidos na resposta de fase aguda, ativação do sistema complemento, resposta inflamatória e resposta imunológica adquirida contra bactérias. Todos os procedimentos e análise de dados foram realizados de acordo com as instruções e software do fabricante.

Tabela 1 – Genes avaliados pelo kit *Human Innate and Adaptive Immune Responses PCR Array*

(continua)

Símbolo	Descrição
APCS	Amyloid P component, serum
C3	Complement component 3
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
CCR6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
CCR8	Chemokine (C-C motif) receptor 8
CD14	CD14 molecule
CD4	CD4 molecule
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
CD40LG	CD40 ligand
CD80	CD80 molecule
CD86	CD86 molecule
CD8A	CD8a molecule
CRP	C-reactive protein, pentraxin-related
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCR3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FOXP3	Forkhead box P3
GATA3	GATA binding protein 3
HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A
HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IFNA1	Interferon, alpha 1
IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
IFNG	Interferon, gamma
IFNGR1	Interferon gamma receptor 1
IL10	Interleukin 10
IL13	Interleukin 13
IL17A	Interleukin 17A
IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
IL1A	Interleukin 1, alpha
IL1B	Interleukin 1, beta
IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I
IL2	Interleukin 2
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19
IL4	Interleukin 4
IL5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)

Tabela 1 – Genes avaliados pelo kit *Human Innate and Adaptive Immune Responses PCR Array*

(continua)

Símbolo	Descrição
CXCL8	Interleukin 8
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRF7	Interferon regulatory factor 7
ITGAM	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
JAK2	Janus kinase 2
LY96	Lymphocyte antigen 96
LYZ	Lysozyme
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble
MPO	Myeloperoxidase
MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
RAG1	Recombination activating gene 1
RORC	RAR-related orphan receptor C
SLC11A1	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
TBX21	T-box 21
TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1
TLR1	Toll-like receptor 1
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR3	Toll-like receptor 3
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR5	Toll-like receptor 5
TLR6	Toll-like receptor 6
TLR7	Toll-like receptor 7
TLR8	Toll-like receptor 8
TLR9	Toll-like receptor 9

Tabela 1 – Genes avaliados pelo kit *Human Innate and Adaptive Immune Responses PCR Array*

(conclusão)

Símbolo	Descrição
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TYK2	Tyrosine kinase 2
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-microglobulin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0

4.8 Análise estatística

As informações clínico-epidemiológicas foram analisadas estatisticamente usando o software SPSS 20.0® (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Para verificação de associação entre variáveis foi aplicado o Teste de Qui-quadrado de Pearson. A significância estatística foi considerada nos casos em que o valor de $p < 0,05$. O nível de confiança adotado para as conclusões foi de 95%. Para a avaliação dos fatores de risco associados às infecções empregou-se o Odds Ratio (OR) em uma análise univariada.

Para comparar as médias de idade entre os grupos caso e controle, após utilizar o teste de Shapiro-Wilk, para checar a distribuição gaussiana (normal) dos dados, foi empregado o teste t-Student.

Para análise dos dados de quantificação do número de cópias dos microrganismos, dosagem de citocinas e expressão gênica foi utilizado o programa GraphPad Prism. Previamente os dados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição normal ou não dos dados. Foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando avaliados dois grupos. Dados expressos pela Média $\pm$ Desvio Padrão (com exceção dos dados de expressão gênica, onde os dados foram gerados e analisados pelo software do kit, sendo apenas usado o GraphPad para representação gráfica dos resultados). A significância estatística foi considerada nos casos em que o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Características demográficas da população estudada

A Tabela 2 apresenta as características demográficas das pacientes incluídas no estudo, separadas nos grupos caso e controle. A média das idades das mulheres participantes foi de 36,39 anos (mín.: 15 e máx.: 51). A maior parte das mulheres declararam-se brancas (71,2%), casadas (73,0%) e/ou em relacionamento estável (90,4%) e reportaram não saber de casos de endometriose na família (74,4%). A maioria das pacientes (48,8%) se enquadrou no perfil saudável quando avaliado o Índice de Massa Corpórea (IMC: 18,5 – 25,0). Não houve significância estatísticas quando avaliadas as variáveis listadas acima ($p > 0,05$) (Tabela 2). A maioria das mulheres declarou ter concluído o curso superior (58,2%), e aquelas com endometriose apresentaram grau de instrução estatisticamente maior que as do grupo controle ($p = 0,015$).

Tabela 2 – Características demográficas da população estudada

(continua)

Características Demográficas	Grupo		Total (N = 104)	Odds Ratio	IC 95%	p*
	Endometriose (n = 73)	Controle (n = 31)				
Idade (anos), n (%)						
Média	35,75	37,90	36,39			0,424 ^g
Mediana (mín.; máx.)	36,00 (15; 49)	39,00 (26; 51)	36,50 (15; 51)			
Raça/Cor, n (%)						
Branca	55 (75,3)	19 (61,2)	74 (71,2)	1,00		0,095 ^g
Preta	2 (2,7)	6 (19,4)	8 (7,7)	0,74	[0,24; 2,24]	
Amarela	3 (4,1)	0 (0)	3 (2,9)	6,50	[1,00; 42,17]	
Parda	13 (17,8)	6 (19,4)	19 (18,3)	ND	-	
Grau de Instrução, n (%)¹						
Superior	39 (66,1)	7 (35,0)	46 (58,2)	10,5	[1,24; 10,5]	0,015[†]
Nenhum/1º	20 (33,9)	13 (65,0)	33 (41,8)			
Grau/2ºGrau						
Estado Civil, n (%)²						
Casada/Amasiada	40 (70,2)	18 (81,8)	58 (73,4)	1,00		0,975 ^g
Separada	3 (5,3)	0 (0)	3 (3,8)	ND	-	
Solteira	12 (21,1)	4 (18,2)	16 (20,3)	1,000	-	
Viúva	2 (3,5)	0 (0)	2 (2,5)	ND	-	
Relação Estável, n (%)³						
Sim	44 (86,3)	22 (100)	66 (90,4)	0,66	[0,56; 0,79]	0,163 ^g
Não	7 (13,7)	0 (0)	7 (9,6)			

Tabela 2 – Características demográficas da população estudada (conclusão)

Características Demográficas	Grupo		Total (N = 104)	Odds Ratio	IC 95%	P*
	Endometriose (n = 73)	Controle (n = 31)				
IMC (kg/m²), n (%) ⁴						
Baixo Peso (< 18,5)	1 (1,6)	2 (9,1)	3 (3,6)	0,96	[0,35; 2,65]	0,351 [‡]
Saudável (18,5 – 25,0)	31 (50,0)	10 (45,5)	41 (48,8)	1,00		
Sobrepeso (> 25,0)	30 (48,4)	10 (45,5)	40 (47,6)	6,00	[0,49; 73,45]	
EDT na Família, n (%) ⁵						
Sim	17 (27,9)	4 (19,0)	21 (25,6)	1,64	[0,48; 5,58]	0,611 [†]
Não	44 (72,1)	17 (81,0)	61 (74,4)			

Nota: Perda de observação: ¹Grau de Instrução: perda de 25 (n = 79); ²Estado Civil: perda de 25 (n = 79); ³Relação estável: perda de 31 (n = 73); ⁴IMC (Índice de Massa Corporal): perda de 20 (n = 84); ⁵EDT prévia na família: perda de 22 (n = 82).

*Valor de p em negrito indica significância estatística (p < 0,05).

⊖ Teste t-Student

† Teste de Qui-quadrado

‡ Teste Exato de Fisher

‡ Razão de Verossimilhança

ND: Não definida

5.2 Características clínicas da população estudada

Na Tabela 3 podem ser observados os aspectos do perfil clínico e a distribuição das pacientes de acordo com as classificações da doença. De acordo com parâmetros da ASRM (1996), 38 pacientes tinham endometriose em estádios iniciais (I e II) e 35 em estádios avançados (III e IV). Destas pacientes, 33,3% estavam na fase folicular do ciclo menstrual, 36,1% estavam na fase lútea e 30,6% estavam em amenorreia devido ao uso de hormônios. O uso de hormônios pelas mulheres foi mais frequente em pacientes com endometriose quando comparado ao grupo controle (p < 0,001). Dentre os sintomas clínicos avaliados, a intensidade de dor de acordo com a escala visual analógica de dor (EAD) pelas pacientes para dor pélvica acíclica, alterações intestinais cíclicas e alterações urinárias cíclicas não foi estatisticamente significativa ao serem comparados os grupos caso e controle (p > 0,05). A intensidade da dor referida pelas mulheres para os sintomas dismenorreia (p < 0,001) e dispareunia (p < 0,009), foi estatisticamente maior nas mulheres com endometriose do que no grupo controle. A queixa de infertilidade foi estatisticamente associada às mulheres com endometriose (p = 0,014),

Tabela 3 – Características clínicas da população estudada e distribuição das pacientes de acordo com as classificações da endometriose

Características Clínicas	Grupo		Total (N = 104)	OR	IC 95%	p*
	Endometriose (n = 73)	Controle (n = 31)				
Hormônio, n (%)¹						
Sim	39 (54,2)	5 (16,7)	44 (43,1)	5,90	[2,03; 17,16]	< 0,001[†]
Não	33 (45,8)	25 (83,3)	58 (56,9)			
Fase do Ciclo, n (%)²						
Sem Ciclo	22 (30,6)	5 (16,1)	27 (26,2)	1,00		0,375 [‡]
Folicular	24 (33,3)	17 (54,8)	41 (39,8)	1,96	[0,64; 5,99]	
Lútea	26 (36,1)	9 (29,0)	35 (34,0)	1,08	[0,32; 3,59]	
Estadiamento (ASRM), n (%)						
I	22 (30,1)		22 (30,1)			
II	16 (21,9)		16 (21,9)			
III	9 (12,3)		9 (12,3)			
IV	26 (35,6)		26 (35,6)			
Sítio mais severo de EDT, n (%)[‡]						
Peritoneal	16 (22,2)		16 (22,2)			
Ovariana	3 (4,2)		3 (4,2)			
Profunda	53 (73,6)		53 (73,6)			
Dismenorreia (EAD), n (%)³						
≥ 7	53 (80,3)	12 (42,9)	65 (69,1)	5,43	[2,07; 14,24]	< 0,001[†]
< 7	13 (19,7)	16 (57,1)	29 (30,9)			
Dor pélvica acíclica (EAD), n (%)⁴						
≥ 7	30 (45,5)	7 (25,0)	37 (39,4)	2,50	[0,93; 6,68]	0,063 [†]
< 7	36 (54,5)	21 (75,0)	57 (60,6)			
Dispareunia (EAD), n (%)⁵						
≥ 7	33 (50,8)	6 (21,4)	39 (41,9)	3,78	[1,35; 10,54]	0,009[†]
< 7	32 (49,2)	22 (78,6)	54 (58,1)			
Alt. intest. cíclicas (EAD), n (%)⁶						
≥ 7	18 (26,9)	3 (10,7)	21 (22,1)	3,06	[0,82; 11,38]	0,145 [†]
< 7	49 (73,1)	25 (89,3)	74 (77,9)			
Alt. urinárias cíclicas (EAD), n (%)⁷						
≥ 7	11 (16,4)	1 (3,6)	12 (12,6)	5,30	[0,65; 43,22]	0,168 [†]
< 7	56 (83,6)	27 (96,4)	83 (87,4)			
Infertilidade (EAD), n (%)⁸						
Sim	31 (47,0)	5 (19,2)	36 (39,1)	3,72	[1,25; 11,04]	0,014[†]
Não	35 (53,0)	21 (80,8)	56 (60,9)			

Nota: Perda de observação: ¹Hormônio: perda de 3 (n = 101); ²Fase do Ciclo/Tipo de EDT: perda de 1 (n = 103); ³Dismenorreia: perda de 10 (n = 94); ⁴Dor pélvica cíclica: perda de 10 (n = 94); ⁵Dispareunia: perda de 11 (n = 93); ⁶Alterações Intestinais: perda de 09 (n = 95); ⁷Alterações Urinárias: perda de 09 (n = 95); ⁸Infertilidade: perda de 14 (n = 92). ⁹Tipo de EDT: perda de 1 (n = 103)

Legenda: EAD = Escala Analógica da Dor; EDT = Endometriose

*Valor de p em negrito indica significância estatística (p < 0,05).

[†] Teste de Qui-quadrado

[‡] Razão de Verossimilhança

‡ O n total refere-se apenas às pacientes com EDT

5.3 Hábitos de vida da população estudada

Quando analisados os hábitos da população estudada pôde-se observar que sua maioria era composta por mulheres não-fumantes (86,9%), com a vida sexual ativa (91,4%), que reportaram fazer sempre uso de preservativo nas relações sexuais (58,2%) e que tiveram de dois a cinco parceiros sexuais ao longo da vida (54,1%) (Tabela 4). Ao compararmos estes hábitos de vida entre os grupos caso e controle, não encontramos diferença estatística ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Hábitos de vida da população estudada

Hábitos	Grupo		Total (N = 104)	Odds Ratio	IC 95%	p*
	Endometriose (n = 73)	Controle (n = 31)				
Tabagismo, n (%) ¹						
Ex-fumante e Fumante	9 (14,5)	2 (9,1)	11 (13,1)	1,69	[0,33; 8,54]	0,779 [†]
Não fumante	53 (85,5)	20 (90,9)	73 (86,9)			
Vida sexual, n (%) ²						
Ativa	59 (88,1)	26 (100,0)	85 (91,4)	0,69	[0,60; 0,79]	0,100 [‡]
Inativa	8 (11,9)	0 (0)	8 (8,6)			
Uso de preservativo, n (%) ³						
Sim	30 (52,6)	16 (72,7)	46 (58,2)	0,41	[0,14;1,21]	0,105 [†]
Não	27 (47,4)	6 (27,3)	33 (41,8)			
N parceiros na vida, n (%) ⁴						
1	16 (35,6)	6 (37,5)	22 (36,1)	1,00		0,858 [¥]
2 – 5	24 (52,3)	9 (56,2)	33 (54,1)	1,87	[0,18; 19,52]	
> 5	5 (11,1)	1 (6,0)	6 (9,8)	1,87	[0,19; 18,32]	

Nota: Perda de observação: ¹Tabagismo: perda de 20 (n = 84); ²Vida sexual: perda de 11 (n = 93); ³Uso de preservativo: perda de 25 (n = 79); ⁴Dismenorreia: perda de 15 (n = 89).

*Significância estatística quando $p < 0,05$

[†] Teste de Qui-quadrado

[‡] Teste Exato de Fisher

[¥] Razão de Verossimilhança

5.4 Perfil de prevalência dos microrganismos na população estudada

A Tabela 5 apresenta a prevalência de cada um dos microrganismos pesquisados nos três tipos de amostra clínica (*swab* endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia), para cada grupo de estudo. Todos os microrganismos-alvo do estudo foram detectados nas amostras de *swab* endocervical de ambos os grupos. Nas amostras de fluido peritoneal, no grupo caso, quatro microrganismos (*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e HPV) foram detectados, ao passo que no grupo controle apenas dois (*M. genitalium* e

M. hominis). Nas amostras de tecido, foram detectados em ambos os grupos *M. genitalium* e HPV. Mas, apenas no grupo caso foi detectado também *M. hominis*. Na tabela 5 o número de amostras analisadas varia devido à falta de amostra clínica para teste.

Ao analisarmos as amostras de *swab* endocervical, a prevalência de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e HPV foi maior nas pacientes com endometriose (14,1%, 43,7%, 8,5% e 5,9% respectivamente) do que no grupo controle (11,1%, 40,7%, 3,7% e 3,7% respectivamente). De forma similar, nas amostras de fluido peritoneal, as prevalências de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e HPV, foram maiores no grupo caso (40,7%, 27,8%, 3,7% e 9,6% respectivamente) do que no grupo controle (20,8%, 16,7%, 0% e 0% respectivamente). Nas amostras de tecido de biópsia, as prevalências de *M. genitalium* (13,2%) e *M. hominis* (5,9%) foram maiores nas mulheres com endometriose do que naquelas sem a doença (6,7% e 0% respectivamente). Nestas amostras, a prevalência de HPV no grupo controle (3,3%) e caso (3,0%) foi bastante similar (Tabela 5).

Ainda na Tabela 5, de forma interessante, observa-se que as prevalências da maioria dos Mollicutes (*M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum*) em cada amostra clínica assumem uma tendência decrescente na ordem *Swab* > Fluido Peritoneal > Tecido de Biópsia, exceto para *M. genitalium*. *N. gonorrhoeae* também apresenta o mesmo perfil quando observado o grupo controle. Por outro lado, assim como *M. genitalium*, não houve a mesma tendência no perfil de detecção do HPV nas diferentes amostras.

Tabela 5 – Perfil de detecção de espécies de *Mollicutes* (*M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*), HPV e *N. gonorrhoeae*, em amostras de swab endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia obtidas de mulheres com e sem endometriose, São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Resultado qPCR	Grupo					
	Endometriose			Controle		
	Swab (n = 73)	Fluido (n = 54)	Tecido (n = 68)	Swab (n = 31)	Fluido (n = 24)	Tecido (n = 30)
<i>M. genitalium</i>, n (%)						
Positivo	10 (14,1)	22 (40,7)	9 (13,2)	3 (11,1)	5 (20,8)	2 (6,7)
Negativo	61 (85,9)	32 (59,3)	59 (86,8)	24 (88,9)	19 (79,2)	28 (93,3)
<i>M. hominis</i>, n (%)						
Positivo	31 (43,7)	15 (27,8)	4 (5,9)	11 (40,7)	4 (16,7)	(0)
Negativo	40 (56,3)	39 (72,2)	64 (94,1)	16 (59,3)	20 (83,3)	30 (100)
<i>U. urealyticum</i>, n (%)						
Positivo	6 (8,5)	2 (3,7)	0 (0)	1 (3,7)	0 (0)	0 (0)
Negativo	65 (91,5)	52 (96,3)	68 (100)	29 (77,8)	24 (100)	30 (100)
<i>U. parvum</i>, n (%)						
Positivo	10 (14,1)	0 (0)	0 (0)	6 (22,2)	0 (0)	0 (0)
Negativo	61 (85,9)	54 (100)	68 (100)	21 (77,8)	24 (100)	30 (100)
Micoplasma, n (%)						
Sim	39 (54,9)	29 (53,7)	36 (52,9)	16 (59,3)	8 (33,3)	16 (53,3)
Não	32 (45,1)	25 (46,3)	32 (47,1)	11 (40,7)	16 (66,7)	14 (46,7)
HPV, n (%)						
Positivo	4 (5,9)	5 (9,6)	2 (3,0)	1 (3,7)	(0)	1 (3,3)
Negativo	64 (94,1)	47 (90,4)	65 (97,0)	26 (96,3)	23 (100)	26 (96,9)
<i>N. gonorrhoeae</i>, n (%)						
Positivo	0 (0)	(0)	0 (0)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)
Negativo	71 (100,0)	54 (100)	68 (100)	28 (93,3)	24 (100)	30 (100)

5.4.1 Perfil de prevalência dos Microrganismos Vs Uso de hormônios

Como houve uso de hormônio por parte das pacientes incluídas no presente estudo, avaliamos se havia associação entre o uso de diferentes tipos de terapia hormonal utilizados pelas pacientes nos três meses anteriores à cirurgia (ACO/Injetável e Sistema Intrauterino Liberador de Levonorgestrel – SIU-LNG) e o perfil de prevalência dos microrganismos nas amostras de swab endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia. Não foi observada associação estatisticamente significativa nas análises ($p > 0,05$) (Apêndices C, D, E e F). Por fim, é válido ressaltar que nenhuma das mulheres reportou o uso de DIU de cobre.

5.5 Perfil de coinfecção e proporção de microrganismos nos grupos de estudo

A coinfecção no presente estudo está definida como a detecção de dois ou mais microrganismos-alvo na mesma amostra clínica. Assim, o perfil de coinfecção dos grupos caso e controle foi analisado e está representado de duas formas. Na primeira forma, apresentada na Figura 5, apenas os *Mollicutes* foram incluídos. Houve diferença estatisticamente significativa na proporção da coinfecção pelas espécies da classe *Mollicutes*, entre os grupos caso e controle ($p < 0,05$). Na segunda análise, apresentada na Figura 6, além dos *Mollicutes* foram incluídos os demais microrganismos (HPV e *N. gonorrhoeae*). De forma similar, houve diferença estatisticamente significativa na proporção da coinfecção das espécies de microrganismos detectados entre os grupos caso e controle ($p < 0,05$). Em ambos resultados há maior diversidade de perfis de coinfecção no grupo caso em relação ao grupo controle nas amostras de *swab* endocervical e fluido peritoneal (Figuras 5A, 5B, 6A e 6B). A comparação do perfil de coinfecção nas amostras de tecido de biópsia entre os grupos mostra ou um perfil de similaridade entre os grupos (Figura 6C) ou de maior diversidade no grupo caso (Figura 5C).

As prevalências das coinfecções, em cada grupo de estudo, por amostra clínica analisada, podem ser observadas na íntegra nos apêndices G, H e I. Nas amostras de *swab* endocervical, as maiores prevalências foram de *M. genitalium* e *M. hominis* (7,7%) e *M. hominis* e *U. parvum* (4,8%). Em todos os casos de coinfecção observados nas amostras de *swab* endocervical, a prevalência foi maior nas mulheres com endometriose quando comparado ao grupo controle (Apêndice G). Nas amostras de fluido peritoneal, as maiores prevalências ocorreram entre *M. genitalium* e *M. hominis* (9%) e *M. genitalium* e HPV (3,8%). As prevalências de coinfecção também foram maiores no grupo caso quando comparado ao grupo controle (Apêndice H). Ao analisar as amostras de tecido de biópsia, não foi observada predominância das prevalências em nenhum dos grupos (caso e controle) do estudo (Apêndice I).

Figura 5 – Proporção de detecção de *Mollicutes* em amostras de swab endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia obtidas de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Legenda: MG: *M. genitalium*; MH: *M. hominis*; UU: *U. urealyticum*; UP: *U. parvum*. (A) Amostras de swab endocervical; (B) Amostras de fluido peritoneal; (C) Amostras de tecido de biópsia. Comparação de proporções por ANOVA – Two way com pós-teste de Bonferroni. Valor de significância estatística determinada no gráfico ($p < 0,05$).

Figura 6 – Proporção de detecção de micoplasmas e outros microrganismos de interesse genital entre as mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle) em amostras de *swab* endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia obtidas de mulheres com e sem endometriose, São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Legenda: MG: *M. genitalium*; MH: *M. hominis*; UU: *U. urealyticum*; UP: *U. parvum*; HPV: Papilomavírus Humano; NG: *N. gonorrhoeae*. (A) Amostras de *swab* endocervical; (B) Amostras de fluido peritoneal; (C) Amostras de tecido de biópsia. Comparação de proporções por ANOVA – Two way com pós-teste de Bonferroni. Valor de significância estatística determinada no gráfico ($p < 0,05$).

5.6 Perfil de carga microbiana dos *Mollicutes* nas amostras

A carga microbiana foi calculada nos ensaios de qPCR, tomando como base a curva padrão de cada experimento; permitindo assim, a quantificação relativa. No presente estudo, só foi possível comparar as cargas microbianas dos *Mollicutes* em não de HPV e *N. gonorrhoeae* por conta do tipo de experimento adotado (PCR para HPV) e pela prevalência baixa ou nula nas amostras clínicas – apenas duas amostras foram positivas para *N. gonorrhoeae* nas amostras de swab endocervical – o que inviabiliza a análise estatística dos dados.

Para avaliar se a carga microbiana encontrada nas amostras clínicas diferia entre os grupos caso e controle, foi feita a quantificação por meio da qPCR. Os grupos caso e controle foram comparados apenas quando a detecção do microrganismo ocorreu em ambos os grupos de forma que permitisse a análise estatística. A Figura 7 mostra o número de cópias de DNA de cada microrganismo nos grupos caso e controle nas amostras de swab. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso (EDT) e controle para as espécies *M. genitalium* (EDT 48 ± 34 cópias/mL; Controle 90 ± 87 cópias/mL; $p = 0,551$), *M. hominis* (EDT $2,6 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^6$ cópias/mL; Controle $2,5 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^4$ cópias/mL; $p = 0,931$), *U. urealyticum* (EDT $4,7 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^4$ cópias/mL; Controle $1,0 \times 10^4 \pm 0$ cópias/mL; $p = 0,857$) e *U. parvum* (EDT $2,9 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^4$ cópias/mL; Controle $6,7 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^4$ cópias/mL; $p = 0,147$). A mesma análise foi feita para as cargas microbianas com os dados de detecção nas amostras de fluido peritoneal (Figura 8). Como é possível observar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso (EDT) e controle para as espécies *M. genitalium* (EDT 100 ± 293 cópias/mL; Controle 37 ± 25 cópias/mL; $p > 0,05$), *M. hominis* (EDT $1,4 \times 10^3 \pm 795$ cópias/mL; Controle $1,1 \times 10^3 \pm 961$ cópias/mL; $p > 0,05$) (Figura 8). Nas amostras de tecido de biópsia, não houve diferença estatística na carga microbiana de *M. genitalium* (EDT 77 ± 30 cópias/mL; Controle 81 ± 50 cópias/mL; $p > 0,05$) quando comparados os grupos (Figura 9).

Figura 7 – Quantificação absoluta por qPCR do número de cópias de espécies de micoplasmas (Cópias/mL) em amostras de *swab* endocervical mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Legenda: (A) Número de cópias de *M. genitalium* nas amostras dos grupos caso e controle (Caso EDT: n = 10; Controle: n = 3) (B) Número de cópias de *M. hominis* nas amostras dos grupos caso e controle (Caso EDT: n = 31; Controle: n = 11); (C) Número de cópias de *U. parvum* nas amostras dos grupos caso e controle (Caso EDT: n = 10; Controle n = 6); (D) Número de cópias de *U. urealyticum* nas amostras dos grupos caso e controle (Caso EDT: n = 6; Controle n = 1);. Desvio padrão e medianas estão indicados por linhas sólidas nos gráficos. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $p < 0,05$.

Figura 8 – Quantificação absoluta por qPCR do número de cópias de espécies de *Mollicutes* em amostras de fluido peritoneal de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Legenda: (A) Número de cópias de *M. genitalium* nas amostras dos grupos caso e controle (Caso EDT: n = 22; Controle: n = 05); (B) Número de cópias de *M. hominis* nas amostras dos grupos caso e controle (Caso EDT: n = 15; Controle: n = 04). Desvio padrão e mediana estão indicados por linhas sólidas nos gráficos. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $p < 0,05$.

Figura 9 – Quantificação absoluta por qPCR do número de cópias de espécies de micoplasmas em amostras de tecido de biópsia em mulheres com e sem endometriose, São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Legenda: (A) Número de cópias de *M. genitalium* nas amostras dos grupos caso e controle (Caso EDT: n = 09; Controle: n = 02). Desvio padrão e mediana estão indicados por linhas sólidas nos gráficos. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $p < 0,05$.

5.7 Detecção microbiana de acordo com o perfil clínico

Após definir o perfil clínico da população estudada e realizar a detecção dos microrganismos nas amostras clínicas, foi avaliada a possível associação entre a detecção dos microrganismos e os sintomas referidos pelas mulheres. Neste contexto, a detecção de *U. parvum* nas amostras de *swab* endocervical foi relacionada à maior severidade do sintoma dispareunia ($EAD \geq 7$; $p = 0,019$) (Tabela 6). Não houve associação dos demais microrganismos (*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum*) detectados nas amostras de *swab* endocervical com a maior severidade dos sintomas ($p > 0,05$). De maneira similar, não foi observada associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os microrganismos (Mollicutes, HPV e *N. gonorrhoeae*) e os sintomas quando observada a prevalência destes nas amostras de fluido peritoneal e de tecido de biópsia. Também não houve associação estatisticamente significativa com a variável infertilidade ($p > 0,05$) (Apêndices J, K e L).

Tabela 6 – Detecção de *Mollicutes* em amostras de swab endocervical por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP.

Sintomas	Distribuição (%) entre qPCR-positivo e negativo por microrganismo para amostras de swab endocervical																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*
Dismenorrea (EAD), n (%)¹																				
≥ 7	9 (69,2)	53 (69,7)	0,97	[0,23; 3,49]	1,000	30 (78,9)	32 (62,7)	2,22	[0,84; 5,84]	0,100	6 (85,7)	56 (68,3)	2,78	[0,31; 24,33]	0,593	11 (78,6)	51 (68,0)	1,72	[0,44; 6,76]	0,636
< 7	4 (30,8)	23 (30,3)				8 (21,1)	19 (37,3)				1 (14,3)	26 (31,7)				3 (21,4)	24 (32,0)			
Dor pélvica cíclica (EAD), n (%)²																				
≥ 7	5 (38,5)	30 (39,5)	0,94	[0,28; 3,20]	0,945	16 (42,1)	19 (37,3)	1,22	[0,51; 2,89]	0,643	2 (28,6)	33 (40,2)	0,59	[0,10; 3,24]	0,839	6 (42,9)	29 (38,7)	1,19	[0,37; 3,78]	0,768
< 7	8 (61,5)	46 (60,5)				22 (57,9)	32 (62,7)				5 (71,4)	49 (59,8)				8 (57,1)	46 (61,3)			
Dispareunia (EAD), n (%)³																				
≥ 7	4 (30,8)	31 (41,3)	0,63	[0,17; 2,23]	0,681	16 (42,1)	19 (38,0)	1,18	[0,50; 2,80]	0,697	2 (28,6)	33 (40,7)	0,58	[0,10; 3,18]	0,819	10 (71,4)	25 (33,8)	4,90	[1,39; 17,19]	0,019
< 7	9 (69,2)	44 (58,7)				22 (57,9)	31 (62,0)				5 (71,4)	48 (59,3)				4 (28,6)	49 (66,2)			
Alt. intest. cíclicas (EAD), n (%)⁴																				
≥ 7	2 (15,4)	17 (22,1)	0,64	[0,13; 3,17]	0,857	10 (26,3)	9 (17,3)	1,70	[0,61; 4,72]	0,301	2 (28,6)	17 (20,5)	1,55	[0,22; 8,71]	0,983	2 (13,3)	17 (22,7)	0,52	[0,10; 2,55]	0,644
< 7	11 (84,6)	60 (77,9)				28 (73,7)	43 (82,7)				5 (71,4)	66 (79,5)				13 (86,7)	58 (77,3)			
Alt. urin. cíclicas (EAD), n (%)⁵																				
≥ 7	1 (7,7)	11 (14,3)	0,50	[0,05; 4,23]	0,837	4 (10,5)	8 (15,4)	0,64	[0,18; 2,32]	0,722	1 (14,3)	11 (13,3)	1,09	[0,12; 9,94]	1,000	2 (13,3)	10 (13,3)	1,00	[0,19; 5,10]	1,000
< 7	12 (92,3)	66 (85,7)				34 (89,5)	44 (84,6)				6 (85,7)	72 (86,7)				13 (86,7)	65 (86,7)			
Infertilidade, n (%)⁶																				
Sim	5 (38,5)	31 (41,9)	0,86	[0,25; 2,90]	0,817	15 (40,5)	21 (42,0)	0,94	[0,39; 2,23]	0,891	3 (50,0)	33 (40,7)	1,45	[0,27; 7,65]	0,657	7 (43,8)	29 (40,8)	1,12	[0,37; 3,36]	0,831
Não	8 (61,5)	43 (58,1)				22 (59,5)	29 (58,0)				3 (50,0)	48 (59,3)				9 (56,2)	42 (59,2)			

Nota: Perda de observação: ¹Dismenorrea: perda de 15 (n = 89); ²Dos pélvica cíclica: perda de 15 (n = 89); ³Dispareunia: perda de 16 (n = 88); ⁴Alterações intestinais cíclicas: perda de 14 (n = 90); ⁵Alterações urinárias cíclicas: perda de 14 (n = 90); ⁶Infertilidade: perda de 17 (n = 87)

* Teste de Qui-quadrado: significância estatística quando p < 0,05

EAD: Escala Analógica de Dor.

Foi avaliada a relação entre a detecção de microrganismos nas amostras clínicas com o estadiamento da endometriose (I – IV) e o sítio mais grave acometido pela doença (peritoneal, ovariana ou profunda). Não houve associação estatisticamente significativa com as espécies de *Mollicutes*. (Apêndice M, N e O) ou com os demais microrganismos (HPV e *N. gonorrhoeae*) (Tabela 7). Contudo, é válido destacar que ao ser avaliada a relação entre a presença de *M. hominis* em amostras de fluido peritoneal e o perfil de estadiamento da endometriose, a significância estatística foi limítrofe (OR 3,55, 95% IC 0,96 – 13,16 $p = 0,050$), como pode ser observado no apêndice N. Além disso, é válido destacar que a detecção de HPV ocorreu de forma marcante dentre as mulheres com endometriose profunda, nas três amostras analisadas (Tabela 7).

Tabela 7 – Perfil de Detecção de HPV por amostra clínica e de *N. gonorrhoeae* no swab endocervical, por meio da qPCR, e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.

Variáveis	Distribuição (%) entre qPCR-positivo e negativo por microrganismo por amostra																			
	HPV															Swab <i>N. gonorrhoeae</i>				
	Swab endocervical					Fluido peritoneal					Tecido de biópsia									
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
ASRM estágio, n (%) ¹																				
I e II	1 (25))	34 (53,1)	0,29	[0,02;2,98]	0,349 [‡]	2 (40,0)	26 (55,3)	0,53	[0,08; 3,52]	0,652 [‡]	0 (0)	34 (52,3)	ND	-	-	0 (0)	37 (52,1)	ND	--	--
III e IV	3 (75)	30 (46,9)				3 (60,0)	21 (44,7)				2 (100)	31 (47,7)				0 (0)	34 (47,9)			
Tipo de Endom, n (%) ²																				
Sem Endometriose	1 (20,0)	26 (29,2)	1,00		0,917 [‡]	0 (0)	23 (32,9)	1,00	--	--	1 (33,3)	29 (30,9)	1,00		1,000 [‡]	2 (100)	28 (28,6)	1,00		--
Peritoneal	0 (0)	15 (16,9)	ND	--		2 (40,0)	8 (11,4)	ND	--		0 (0)	13 (13,8)	ND	--		0 (0)	15 (15,3)	ND	--	
Ovariana	0 (0)	2 (2,2)	ND	--		0 (0)	2 (2,9)	ND	--		0 (0)	2 (2,1)	ND	--		0 (0)	2 (2,0)	ND	--	
Profunda	4 (80,0)	46 (51,7)	0,44	[0,04; 4,16]		3 (60,0)	37 952,9)	ND	--		2 (66,7)	50 (53,2)	0,86	[0,75; 9,92]		0 (0)	53 (54,1)	ND	--	

Nota: Perda de observação: ¹ASRM estágio: Swab HPV – perda de 36 (n = 68); Fluido HPV – perda de 52 (n = 52); Tecido de biópsia – perda de 37 (n = 67); Swab *N. gonorrhoeae* – perda de 33 (n = 71).

Nota: Perda de observação: ²Tipo de Endometriose: Swab HPV - perda de 10 (n = 94); Fluido peritoneal HPV – perda de 29 (n = 75); Tecido de Biópsia HPV – Perda de 07 (n = 97); Swab *N. gonorrhoeae* – perda de 4 (n = 100).

*Significância estatística quando p < 0,05

[‡] Razão de Verossimilhança

Ao ser avaliada a relação entre a detecção de *Mollicutes*, HPV e *N. gonorrhoeae*, nas amostras clínicas de swab endocervical e o quadro clínico das pacientes, não foi observada associação estatisticamente significativa (Tabela 8, 9 e 10).

Tabela 8 – Detecção de *Mollicutes*, HPV e *N. gonorrhoeae* em amostras de swab por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico das pacientes incluídas.

Resultado qPCR	Amostras de swab endocervical					
	Grupo		Total (N = 104)	Odds Ratio	IC 95%	p*
	Endometriose (n = 73)	Controle (n = 31)				
M. genitalium, n (%)¹						
Positivo	10 (14,1)	3 (11,1)	13 (13,3)	1,31	[0,33; 5,18]	0,698
Negativo	61 (85,9)	24 (88,9)	85 (86,7)			
M. hominis, n (%)¹						
Positivo	31 (43,7)	11 (40,7)	42 (42,9)	1,12	[0,45; 2,77]	0,794
Negativo	40 (56,3)	16 (59,3)	56 (57,1)			
U. urealyticum, n (%)¹						
Positivo	6 (8,5)	1 (3,7)	7 (7,1)	2,4	[0,27; 20,92]	0,415
Negativo	65 (91,5)	26 (96,3)	91 (92,9)			
U. parvum, n (%)¹						
Positivo	10 (14,1)	6 (22,2)	16 (16,3)	0,57	[0,18; 1,77]	0,330
Negativo	61 (85,9)	21 (77,8)	82 (83,7)			
Micoplasma, n (%)¹						
Sim	39 (54,9)	16 (59,3)	55 (56,1)	0,83	[0,34; 2,05]	0,700
Não	32 (45,1)	11 (40,7)	43 (43,9)			
HPV, n (%)²						
Positivo	4 (5,9)	1 (3,7)	5 (5,3)	1,62	[0,17; 15,23]	1,000 [‡]
Negativo	64 (94,1)	26 (96,3)	90 (94,7)			
N. gonorrhoeae, n (%)³						
Positivo	0 (0)	2 (6,7)	2 (2,0)	3,53	[2,58; 4,83]	0,086 [‡]
Negativo	71 (100,0)	28 (93,3)	99 (98,0)			

Nota: Perda de observação: ¹*M. genitalium*; *M. hominis*; *U. urealyticum* e *U. parvum*: perda de 6 (n = 98); ²HPV: perda de 9 (n = 95); ³*N. gonorrhoeae*: perda de 3 (n = 101).

*Teste de Qui-quadrado, significativo quando p < 0,05

‡Teste Exato de Fisher

Tabela 9 – Detecção de Mollicutes, HPV e *N. gonorrhoeae* em amostras de fluido peritoneal por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico das pacientes incluídas.

Resultado qPCR	Amostras de Fluido Peritoneal			Total (N = 78)	Odds Ratio	IC 95%	p*
	Grupo						
	Endometriose (n = 54)	Controle (n = 24)					
M. genitalium, n (%)¹							
Positivo	22 (40,7)	5 (20,8)	27 (34,6)	2,61	[0,84; 8,04]	0,088†	
Negativo	32 (59,3)	19 (79,2)	51 (65,4)				
M. hominis, n (%)¹							
Positivo	15 (27,8)	4 (16,7)	19 (24,4)	1,92	[0,56; 6,56]	0,442†	
Negativo	39 (72,2)	20 (83,3)	59 (75,6)				
U. urealyticum, n (%)¹							
Positivo	2 (3,7%)	0 (0)	2 (2,6)	ND	--	--	
Negativo	52 (96,3)	24 (100)	76 (97,4)				
U. parvum, n (%)¹							
Positivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	--	--	
Negativo	54 (100)	24 (100)	78 (100)				
Micoplasma no Fluido, n (%)²							
Sim	29 (53,7)	8 (33,3)	37 (47,4)	2,32	[0,85; 6,32]	0,096†	
Não	25 (46,3)	16 (66,7)	41 (52,6)				
HPV, n (%)³							
Positivo	5 (9,6)	0 (0)	5 (6,7)	ND	--	--	
Negativo	47 (90,4)	23 (100)	70 (93,3)				
N. gonorrhoeae, n (%)⁴							
Positivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	--	--	
Negativo	54 (100)	24 (100)	78 (100)				

Nota: Perda de observação: ¹qPCR para Mollicutes: perda de 26 (n = 78); ²Infecção por micoplasmas: perda de 26 (n = 78); ³qPCR HPV: perda de 29 (n = 75); ⁴qPCR *N. gonorrhoeae*: perda de 26 (n = 78).

ND: Não definida

*p valor estatisticamente significativo se < 0,05.

†Teste de Qui-quadrado

Tabela 10 – Detecção de Mollicutes, HPV e *N. gonorrhoeae* em amostras de tecido por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico das pacientes incluídas.

Resultado qPCR	Amostras de Tecido		Total (N = 98)	Odds Ratio	IC 95%	p*
	Grupo					
	Endometriose (n = 68)	Controle (n = 30)				
<i>M. genitalium</i> , n (%) ¹						
Positivo	9 (13,2)	2 (6,7)	11 (11,2)	2,13	[0,43; 10,54]	0,547†
Negativo	59 (86,8)	28 (93,3)	87 (88,8)			
<i>M. hominis</i> , n (%) ¹						
Positivo	4 (64,0)	0 (0)	4 (4,1)	ND	--	--
Negativo	64 (94,1)	30 (100)	94 (95,9)			
<i>U. urealyticum</i> , n (%) ¹						
Positivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	--	--
Negativo	68 (100)	30 (100)	98 (100)			
<i>U. parvum</i> , n (%) ¹						
Positivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	--	--
Negativo	68 (100)	30 (100)	98 (100)			
Micoplasma no Tec., n (%) ¹						
Sim	36 (52,9)	16 (53,3)	52 (53,1)	1,03	[0,41; 2,32]	0,971†
Não	32 (47,1)	14 (46,7)	46 (46,9)			
HPV, n (%) ²						
Positivo	2 (3,0)	1 (3,3)	3 (3,1)	0,89	[0,07; 10,23]	1,000 [‡]
Negativo	65 (97,0)	29 (96,7)	94 (96,9)			
<i>N. gonorrhoeae</i> , n (%) ³						
Positivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	--	--
Negativo	68 (100)	30 (100)	98 (100)			

Nota: Perda de observação: ¹qPCR para microrganismos: perda de 6 (n = 98); ²qPCR para HPV: perda de 7 (n = 97); ³qPCR para *N. gonorrhoeae*: perda de 6 (n = 98).

ND: Não definida

*p valor estatisticamente significativo se < 0,05.

[†]Teste de Qui-quadrado

[‡]Teste de Fisher

5.8 Padrões de resposta imune na população estudada

A Figura 10 indica a relação entre a condição clínica de cada grupo de pacientes e a concentração das citocinas na amostra de fluido peritoneal. É possível observar que IFN- γ teve produção aumentada no grupo de mulheres caso infectadas por *M. genitalium* (EDT + MG) quando comparadas com os grupos controle (CN) ($p = 0,049$) e caso (EDT) ($p = 0,012$), ambos sem infecção (Figura 6A). Perfil similar ocorreu para a produção de IL-1 β (Figura 10B). Outra citocina pró-inflamatória a qual também apresentou níveis elevados nos grupos caso (EDT e EDT+ MG) em comparação ao grupo controle (CN) foi IL-6 (Figura 10F). A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa e indicam maior produção da citocina relacionada à doença e, em concentração menor, quando associada à infecção por *M. genitalium*. É válido ressaltar que, assim como mostrado no apêndice G, 63% das pacientes caso e positivas para *M. genitalium* tinham endometriose profunda. As citocinas IL-12, IL-13, IL-18, TNF- α e IL-10 não apresentaram concentrações com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Outras citocinas avaliadas no fluido peritoneal, neste mesmo ensaio, apresentaram valores de dosagens abaixo do limite de detecção da curva padrão de referência e não estão representadas.

Figura 10 – Quantificação de citocinas em amostras de fluido peritoneal de mulheres sem endometriose (grupo controle) e mulheres com endometriose (grupo caso).

Legenda: CN: Mulheres controle sem infecção por micoplasmas; CN + MG: Mulheres controle positivas para *M. genitalium*; CN + MH: Mulheres controle positivas para *M. hominis*; EDT: Mulheres caso sem infecção por micoplasmas; EDT + MG: Mulheres caso positivas para *M. genitalium*; EDT + MH: Mulheres caso positivas para *M. hominis*; EDT + UU: Mulheres caso positivas para *U. urealyticum*. (A) IFN- γ ; (B) IL-1 β ; (C) IL-12; (D) IL-13; (E) IL-18; (F) IL-6; (G) TNF- α ; (H) IL-10. Dados expressos pela Média $\pm$ Desvio Padrão. $p < 0,05$.

As Figuras 11 e 12 apresentam as dosagens das citocinas nos tecidos de biópsia obtidos de mulheres com e sem endometriose, infectadas ou não por *Mollicutes*. O grupo controle infectado com *M. genitalium* (CN + MG) apresentou níveis mais elevados de produção de IFN- γ quando comparado ao grupo controle não infectado (CN; $p = 0,005$) e ao grupo caso também infectado com *M. genitalium* (EDT + *M. genitalium*; $p = 0,022$) (Figura 11A). As citocinas IL-18 e IL-13 apresentaram níveis mais altos no grupo controle infectado com *M. genitalium* (CN + MG) quando comparado ao grupo controle não infectado (CN; $p < 0,05$) (Figura 11B e 11E). Nas figuras 12B e 12E, de forma similar, TNF- α e IL-23 apresentaram níveis mais elevados no grupo controle infectado com *M. genitalium* (CN + MG) quando comparado ao grupo controle não infectado (CN; $p < 0,05$). As demais citocinas analisadas não apresentaram diferenças significativas em seus níveis de produção, quando comparados os grupos ($p > 0,05$).

Figura 11 – Quantificação de citocinas em amostras de tecido de biópsia de mulheres sem endometriose (grupo controle) e mulheres com endometriose (grupo caso).

Legenda: CN: Mulheres controle sem infecção por micoplasmas; CN + MG: Mulheres controle positivas para *M. genitalium*; CN + MH: Mulheres controle positivas para *M. hominis*; EDT: Mulheres caso sem infecção por micoplasmas; EDT + MG: Mulheres caso positivas para *M. genitalium*; EDT + MH: Mulheres caso positivas para *M. hominis*; (A) IFN- γ ; (B) IL-18; (C) IL-1 β ; (D) IL-12; (E) IL-13; (F) IL-6. Dados expressos pela Média $\pm$ Desvio Padrão.

Figura 12 – Quantificação de citocinas em amostras de tecido de biópsia de mulheres sem endometriose (grupo controle) e mulheres com endometriose (grupo caso).

Legenda: CN: Mulheres controle sem infecção por micoplasmas; CN + MG: Mulheres controle positivas para *M. genitalium*; CN + MH: Mulheres controle positivas para *M. hominis*; EDT: Mulheres caso sem infecção por micoplasmas; EDT + MG: Mulheres caso positivas para *M. genitalium*; EDT + MH: Mulheres caso positivas para *M. hominis*; (A) IL-6; (B) TNF- α ; (C) IL-17; (D) IL-21; (E) IL-23; (F) IL-9. Dados expressos pela Média $\pm$ Desvio Padrão.

5.9 Perfil da expressão gênica na população estudada

As figuras de 13 a 17 mostram a análise de expressão de genes ligados às vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida em amostras de tecido de biópsia e fluido peritoneal. A Figura 13 mostra que, dos 84 genes analisados, 11 estavam em *upregulation* (verde) e dois estavam em *downregulation* (vermelha), quando comparados os tecidos de biópsia de lesão de endometriose (grupo caso) e o tecido de biópsia de peritônio sadio (grupo controle). Houve diferença estatística entre os dois grupos para todos os genes que estavam em *upregulation* (*TLR8*, *TLR2*, *TLR1*, *IL1R1*, *IL1B*, *IFNG*, *IFNB1*, *CRP*, *CD86*, *CASP1* e *APCS*). Dos genes em *downregulation*, apenas *IFNAR1* apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$). Não foi observado diferença de expressão gênica entre mulheres com endometriose com ou sem *M. genitalium*.

Figura 13 – Análise de expressão gênica no tecido de biópsia de mulheres com endometriose (grupo caso) comparado com tecido de biópsia de mulheres sem endometriose (grupo controle).

Legenda: *Upregulation* (verde) e *downregulation* (vermelho) de genes ligados às vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0,05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism® version 6.01).

A Figura 14, por sua vez, mostra a análise de expressão gênica de células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose (grupo caso) e sem endometriose (grupo controle). Na figura observa-se que, nas células, o perfil de *downregulation* ocorreu para a maior parte dos genes; 28 no total. Destes, cinco apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*SLC11A1*, *NLRP3*, *NFKBIA*, *ITGAM* e *CD80*). Os dois genes que em *upregulation* não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 14 – Análise de expressão gênica nas células do fluido peritoneal de mulheres com endometriose (grupo caso) comparado fluido peritoneal de mulheres sem endometriose (grupo controle).

Legenda: *Upregulation* (verde) e *downregulation* (vermelho) de genes ligados as vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0.05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism® version 6.01).

Na figura 15, é possível observar o perfil de expressão gênica das células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e infectadas por *M. genitalium*, em comparação com mulheres também com endometriose e sem infecção por nenhum dos *Mollicutes* pesquisados nas amostras. Observou-se a acentuação do perfil em *downregulation* de uma quantidade ainda maior de genes (n = 46). Ao todo, oito genes em *downregulation* apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*TYK2*, *TBX21*, *STAT1*, *MX1*, *IL5*, *HLA-A*, *CD86* e *CD14*).

Figura 15 – Análise de expressão gênica de células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose positivas para *M. genitalium* comparado com células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose sem infecção por micoplasmas.

Legenda: *Upregulation* (verde) e *down-regulation* (vermelho) de genes ligados as vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0.05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism® version 6.01).

A Figura 16, mostra o perfil de expressão gênica das células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose. Contudo, compara-se o grupo de mulheres infectadas por *M. hominis* e de mulheres também com endometriose e sem infecção por nenhum dos *Mollicutes* pesquisados nas amostras. Observou-se que na presença de *M. hominis* o perfil de expressão muda para a acentuação da *upregulation* de diversos genes ($n = 42$). Destes, quatro genes em *upregulation* (*STAT6*, *MAPK1*, *IRF3* e *GATA3*) apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Apenas dois genes estavam em *downregulation*, um deles (*CD4*) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 16 – Análise de expressão gênica de células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose positivas para *M. hominis* comparado com células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose sem infecção por micoplasmas.

Legenda: *Upregulation* (verde) e *down-regulation* (vermelho) de genes ligados as vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0.05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism® version 6.01).

A Figura 17, mostra o perfil de expressão gênica das células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e infectadas por qualquer micoplasma em comparação com mulheres também com endometriose e sem infecção por nenhum dos micoplasmas. Observa-se que o perfil de *downregulation* prevalece para a maioria dos genes analisados ($n = 30$). Apenas um gene apresentou *upregulation*. Dentre os genes em *downregulation*, sete genes (*TBX21*, *MAPK8*, *IRAK1*, *IFNGR1*, *HLA-A* e *CDA4*) apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 17 – Análise de expressão gênica de células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose positivas para qualquer micoplasma comparado com células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose sem infecção por micoplasmas.

Legenda: *Upregulation* (verde) e *downregulation* (vermelho) de genes ligados as vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0.05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism® version 6.01).

6 DISCUSSÃO

Descrita há mais de 300 anos, a endometriose ainda é uma doença subdiagnosticada. Nas últimas décadas, testemunhou-se evolução na compreensão de diferentes aspectos associados à doença. Contudo, compreender a patogênese e patofisiologia da doença é ainda essencial para melhor diagnóstico e tratamento (BURNEY; GIUDICE, 2012). O diagnóstico da doença pode demorar de 3,8 a 7 anos para ser feito. Isto provoca significativo impacto na qualidade de vida da mulher pela característica debilitante (HUSBY; HAUGEN; MOEN, 2003; SANTOS et al., 2012). O diagnóstico tardio ocorre pela inespecificidade do quadro clínico e a necessidade do diagnóstico cirúrgico (BELLELIS et al., 2011; BURNEY; GIUDICE, 2012).

Diferentes fatores de risco foram associados à endometriose como; idade, raça, altura, peso, status socioeconômico, outros (ACIEN; VELASCO, 2013; MISSMER et al., 2004). Dentre os fatores mencionados neste estudo, não observamos associações estatisticamente significantes ($p > 0,05$) com a doença, exceto com o grau de instrução das mulheres ($p = 0,015$). Não sabemos ainda porque mulheres com maior grau de instrução estão associadas à prevalência da doença. Pesquisadores sugerem associação com o nível socioeconômico mais elevado que facilitaria o acesso à assistência médica de forma precoce (HEMMINGS et al., 2004; MOINI et al., 2013). Consideramos que o estilo de vida da mulher na atualidade, com altos níveis de estresse, por conta da busca por sucesso profissional, tendência de ter menos filhos e adiamento da gravidez contribuam para o perfil observado.

Pacientes com endometriose apresentam como queixas frequentes sintomas como: dismenorreia, dor pélvica crônica, dispareunia de profundidade, alterações intestinais e urinárias cíclicas como dor ou sangramento ao evacuar/urinar, durante o período menstrual, além de referirem infertilidade (BELLELIS; PODGAEC; ABRÃO, 2014; RIAZI et al., 2015). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com a literatura pela associação da doença com os sintomas dismenorreia e dispareunia na população estudada ($EAD \geq 7$). Em conformidade com a literatura, a infertilidade foi outro fator associado à endometriose neste estudo. É válido ressaltar que, ao analisarmos apenas a presença ou ausência de cada sintoma, os sintomas dor

pélvica acíclica e alterações intestinais cíclicas também foram estatisticamente associados ao grupo caso ($p < 0,05$) (Dado não mostrado). Apesar deste perfil clínico descrito na literatura, a prevalência destes sintomas pode variar consideravelmente nas pacientes (de 30% a 80%) (HEMMINGS et al., 2004; PERRY, 2005). O diagnóstico da endometriose ainda é um assunto de preocupação e recomenda-se a abordagem mais criteriosa e abrangente dos achados clínicos de cada paciente para diagnóstico e manejo precoce (RIAZI et al., 2015).

No presente estudo, o uso de terapia hormonal pelas pacientes foi associado à endometriose. Acreditamos que isto tenha ocorrido pois esta é uma das alternativas da rotina clínica para tratamento de pacientes com endometriose que apresentam os sintomas de forma acentuada (MELIS et al., 2016). Assim, é compreensível que muitas solicitassem o tratamento para que melhorassem os sintomas e, conseqüentemente, sua qualidade de vida até a cirurgia. Neste contexto, dentre os diferentes medicamentos disponíveis, são amplamente utilizados os agonistas de GnRH (GnRHa) (MELIS et al., 2016). Estes medicamentos atuam provocando um estado hipoestrogênico no organismo das pacientes com diminuição da doença e melhora dos sintomas (BULLETTI et al., 2010). Em contrapartida, mulheres tratadas com GnRHa com e sem endometriose podem estar mais expostas à colonização bacteriana intrauterina. Isto ocorreria justamente em decorrência do estado hipoestrogênico provocado pelo tratamento. Esteroides, especialmente o estrogênio, são responsáveis por regular o número de peptídeos antimicrobianos (como defensinas e inibidor de protease secretada por leucócitos) no trato genitourinário e tubas uterinas (KHAN et al., 2016).

Após o início da vida sexual, diversos microrganismos podem ser encontrados no trato urogenital das mulheres. Micoplasmas por sua vez podem ser isolados do trato genital inferior de indivíduos saudáveis e mais comumente de indivíduos com distúrbios de etiologia infecciosa (WAITES et al., 2005). As espécies *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum* têm sido mais associadas a diferentes distúrbios, como doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade e uretrite não gonocócica (UNG) (TAYLOR-ROBINSON et al., 2012). Tendo em vista que apenas infecções por HIV e *Treponema pallidum*, agente etiológico da sífilis, são de notificação obrigatória no Sistema de Agravos de

Notificação (SINAN) no Brasil, dados epidemiológicos das Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs), em âmbito nacional, ainda são escassos (BRASIL, 2012).

Assim, conforme proposto neste estudo, foi aplicada a metodologia da qPCR para detectar microrganismos de importância genital em amostras clínicas, para fornecer mais dados epidemiológicos nacionais das ISTs, além de avaliar as possíveis implicações destes agentes na etiopatogênese da endometriose. Apesar do ainda alto custo para os serviços de saúde (NASCIMENTO, et al., 2010), a qPCR foi o método escolhido para este estudo devido a sua maior sensibilidade na detecção de microrganismos fastidiosos, como micoplasmas, quando comparado à cultura (AMIRMOZAFARI et al., 2009; SONAWANE; TRIPATHI, 2013).

Dentre os *Mollicutes* estudados, *M. genitalium* é descrito atualmente como uma IST emergente (MUNOZ; GOJE, 2016; SONNENBERG et al., 2015). Esta espécie é um dos agentes etiológicos da UNG em homens, e de inflamação cervical, de síndromes do trato genital superior, como a doença inflamatória pélvica (DIP) e infertilidade em mulheres (MOBLEY et al., 2012). Contudo, abordagens ou controvérsias da literatura dificultam a compreensão da participação de *M. genitalium* na infecção e seu impacto na saúde humana. Assim, seu papel na DIP, infertilidade e gravidez ainda não é conhecido e, portanto, ainda faltam estudos nesta área (MUNOZ; GOJE, 2016).

No presente estudo, foi observada a prevalência de 13% de *M. genitalium* nas amostras de *swab* endocervical. Os resultados da literatura mencionam que as prevalências deste micoplasma variaram de 0% a 42% (FALK; FREDLUND; JENSEN, 2005; SETHI et al., 2012). No presente estudo, a prevalência foi maior do que em outro estudo realizado no sul do Brasil (0,9%) por meio da PCR convencional (ANDERSEN et al., 2007) e menor do que em nosso estudo prévio (32,2%) com uso da qPCR em pacientes do Nordeste do país (CAMPOS et al., 2015). Como observado, a prevalência deste microrganismo em amostras de *swab* endocervical pode variar bastante. As diferenças nos métodos utilizados e o contexto sociocultural no qual cada estudo foi realizado podem justificar as variações. Neste sentido, revisões sistemáticas e a realização de estudos que avaliem as possíveis variáveis com viés epidemiológico poderiam justificar melhor esta relação.

A participação de *M. hominis* nas infecções genitais ainda é controverso, principalmente por não haver consenso se esta espécie faz parte da microbiota do trato reprodutor feminino (LARSEN; HWANG, 2010). De fato, estudo realizado por Astrauskiene et al., (2012) reportou prevalência de 3,3% em mulheres lituanas virgens, o que reforça este argumento. Contudo, é preciso salientar que prevalências de 1,3% e 2,6% (MAEDA et al., 2004), 12,1% (JOMBO; ENENEBEAKU, 2008) e 16,5% (DOH et al., 2004) já foram descritas em mulheres com e sem distúrbios genitais. Em estudo realizado também no sudeste do Brasil, prevalência de 21,9% foi descrita (RODRIGUES et al., 2011). Outro estudo recente realizado com mulheres na cidade de São Paulo, atendidas em clínica de diagnóstico laboratorial não governamental, reportou prevalência de 3,42% (MILANEZI et al., 2016). A alta prevalência descrita no presente estudo (43%), quando analisadas amostras de *swab* endocervical, pode estar associada ao método diagnóstico empregado quando comparado aos demais estudos, os quais, majoritariamente, utilizaram a PCR convencional ou a cultura como métodos. Nesse contexto, um exemplo é o estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa que reportou prevalência de 15,9% quando utilizada a PCR convencional e de 31,8% (CAMPOS et al., 2015) quando utilizada a qPCR. Além disso, fatores associados ao contexto geográfico e social de cada população podem justificar a variação da prevalência.

Espécies do gênero *Ureaplasma* estão envolvidas na patogênese de diversas doenças, como uretrite não-gonocócica e não-clamidal em homens, vaginose bacteriana, corioamnionite e eventos como parto prematuro (PATEL; NYIRJESY, 2010; WAITES et al., 2005). Prevalência de 7% e 16% foram observadas para *U. urealyticum* e *U. parvum*, respectivamente, dentre as pacientes do presente estudo, sendo estes resultados não muito diferentes de outros estudos. Cunningham et al., (2013) descreveram prevalência de 12% para *U. urealyticum* em amostras do trato geniturinário e, em estudo realizado por BERLE et al., (2012), na Rússia, descreveram prevalência similar (12,8%) em amostras de urina. Ambos os trabalhos utilizaram a qPCR como método diagnóstico. De forma interessante, a prevalência da infecção pelo gênero *Ureaplasma* sp. no presente estudo (21%), não foi alta como observada em outros trabalhos que reportaram prevalências de 41% (CUNNINGHAM et al., 2013) e 41,7% (YAMAZAKI et al., 2012). Por outro lado, como esperado, a

prevalência de *U. parvum* foi maior que a de *U. urealyticum* como descrito por outros autores (BAO et al., 2010; DE FRANCESCO et al., 2009; GUPTA et al., 2009; HUMBURG et al., 2012).

O HPV é considerado causa necessária para o desenvolvimento do câncer cervical; quarto tipo de câncer mais comum nas mulheres em todo o mundo (IARC, 2012). No presente estudo, 5% das amostras clínicas de *swab* endocervical foram qPCR-positivas. A prevalência descrita no período de 1989 a 2008 em diferentes estados do Brasil (São Paulo, Pará, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Ceará e Rio de Janeiro) variou de 13,7% a 54,3% (AYRES; SILVA, 2010). A baixa prevalência, ao compararmos com outros estudos nacionais, pode estar associada ao perfil da população atendida nas clínicas (maior número de mulheres com ensino superior completo), aliado à qualidade do serviço em acompanhar as mulheres por meses até o momento da cirurgia com exames constantes.

Neisseria gonorrhoeae, agente etiológico da IST gonorreia ou blenorragia, pode causar cervicite, doença inflamatória pélvica e infertilidade nas mulheres. Comumente infecta a cérvix uterina de forma assintomática (ASHSHI et al., 2015). No presente estudo, foi detectada apenas em amostras de *swab* endocervical, com prevalência de 1,9%. Este dado está de acordo com a prevalência encontrada nas américas, dentre as mulheres (2,0%) (WHO, 2014). A maior incidência normalmente ocorre em adultos jovens (15 a 29 anos) e, em muitos países, em homens que fazem sexo com homens (BIGNELL et al., 2013).

Até o momento, não foram encontrados estudos que relacionassem a pesquisa de micoplasmas em amostras de fluido peritoneal e/ou tecido de biópsia da cavidade abdominal com a endometriose. Os dados apresentados evidenciam de forma interessante a tendência da diminuição da prevalência da maioria dos *Mollicutes* (*M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*) quando avaliadas, nesta ordem: amostras de *swab* endocervical, fluido peritoneal e lesão de endometriose/peritônio sadio. Para *M. hominis*, as prevalências para as três amostras clínicas foram de 43%, 17,9% e 3,8% respectivamente. Para *U. urealyticum* foram de 7,0%, 1,9% e 0% respectivamente. Para *U. parvum*, foram de 16,0%, 0% e 0% respectivamente. Esta tendência observada, em teoria, acompanha a hipótese proposta por Khan et al., (2016) de que o fluxo retrógrado da menstruação carregaria parte dos microrganismos através das trompas de

falópio, alcançando os ovários. Acreditamos que, assim como proposto pela teoria de Sampson, ao alcançar tal sítio anatômico este tecido seria extravasado para a cavidade peritoneal. Esta hipótese, também proposta por Khan et al. (2016), explicaria os achados de microrganismos nas amostras de fluido peritoneal e de tecido colhido da cavidade abdominal. A hipótese proposta por estes autores é reforçada pelos achados destes em seus estudos, nos quais evidenciaram a presença de diferentes microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida* sp, *Gardnerella* sp. dentre outros) na cavidade uterina (KHAN et al., 2010; KHAN et al., 2014), além do fluido cístico ovariano em mulheres com endometriose (KHAN et al., 2016) e indícios de colonização da cavidade peritoneal ao reportarem a presença de endotoxinas em fluido peritoneal (KHAN et al., 2010). As evidências demonstradas por estes autores reforçam a hipótese de que a cavidade uterina e demais sítios anatômicos onde são encontradas lesões de endometriose podem ser colonizados com frequência dada a dinâmica proposta pela teoria de Sampson. É válido ressaltar que os estudos citados (KHAN et al., 2010; KHAN et al., 2014) utilizaram a cultura como método de detecção e, portanto, atestam a viabilidade destes microrganismos nas amostras clínicas obtidas, diferente do método adotado no presente estudo. Apesar das dificuldades inerentes ao cultivo de microrganismos fastidiosos, como micoplasmas, seria desafiador, porém interessante e recomendável, estudo futuro e mais extenso com uso desta abordagem.

Assim, em nosso estudo, apesar da ausência de dados em literatura, propõe-se duas explicações para a diminuição da prevalência destes microrganismos nas amostras clínicas na ordem *swab* endocervical, fluido peritoneal e tecido de biópsia: (i) durante a migração do tecido por meio da menstruação retrógrada haveria a diminuição da carga microbiana dos microrganismos ao longo do trajeto, (ii) como o fluido peritoneal se apresenta como um ultrafiltrado do plasma sanguíneo extravasado através do peritônio, o acúmulo natural deste em determinadas regiões anatômicas da pelve como o Fundo de Saco de Douglas, favoreceria a amostragem de material proveniente de diferentes regiões anatômicas ao mesmo tempo. Isto justificaria também a prevalência menor encontrada nos tecidos de ambos os grupos por se tratar de amostra restrita a determinada região anatômica e, ainda, ao fato de que nem todas as amostras analisadas foram de lesões superficiais.

De forma interessante e intrigante, os achados para *M. genitalium* foram diferentes dos demais microrganismos e não apresentaram o mesmo padrão observado. As prevalências encontradas nas amostras de swab endocervical, fluido e tecido foram de 13,0%, 25,5% e 10,4% respectivamente. Aspectos associados à epidemiologia e patogenicidade de *M. genitalium* podem ajudar a explicar estes achados. Grzesko et al., (2009) reportaram a detecção de *M. genitalium* em 8,4% das amostras de líquido obtido da cavidade abdominal de mulheres, prevalência menor que a observada no presente estudo. Estudo realizado por Manhart et al., (2004) reportaram a prevalência de 16% em amostras de biópsia de endométrio de mulheres com endometrite aguda (MANHART, et al., 2004). Outro estudo realizado por Ashshi et al., (2015), por sua vez, detectaram *M. genitalium* (14,1%) nas tubas uterinas de mulheres que tiveram gravidez ectópica. Estes relatos associados aos resultados obtidos por Baczynska et al., (2007), ao descreverem a capacidade de *M. genitalium* de se aderir ao epitélio da tuba uterina mostram que o microrganismo é capaz de infectar o trato reprodutivo superior. Com sua capacidade de gerar infecções, muitas vezes oligossintomáticas nestes sítios anatômicos, tratamento mais adequado não é oferecido às pacientes (GRZESKO et al., 2009). Assim, sugerimos que a capacidade inerente à patogênese das infecções provocadas por *M. genitalium* façam com que este persista por mais tempo no trato reprodutivo superior e, assim, seja carregado para a cavidade peritoneal durante a menstruação retrógrada com maior facilidade. Este contexto justificaria sua detecção na cavidade peritoneal e não necessariamente em concomitância com a detecção no swab endocervical. Além disso, a detecção de *M. genitalium* nas amostras de fluido peritoneal, também foi associada ao sintoma dismenorreia, quando independente da nota de dor referida pelo paciente ($p < 0,05$) (Dado não mostrado). Outros estudos descreveram associação deste microrganismo com diferentes sintomas e condições como a ocorrência de doença inflamatória pélvica (DIP) (HAGGERTY; TAYLOR, 2011), corrimento vaginal (KORTE et al., 2006; WALKER et al., 2011), uretrite (MOI et al., 2009) e cervicite (FALK et al., 2005; JENSEN, 2004). Por outro lado, não há menção da associação entre a infecção por *M. genitalium* com sintomas como dor pélvica, sinusiorragia e dispareunia (KORTE et al., 2006; SHORT et al., 2010). Esta inespecificidade e inconsistência entre a detecção de *M. genitalium* e os sintomas e condições

clínicas associadas contribui para que este panorama ainda dificulte a observação clínica. Apesar dos fortes indícios de reações à infecção causada por *M. genitalium* e da reconhecida capacidade de gerar infecção persistente no hospedeiro, o diagnóstico, e, conseqüentemente, tratamento das infecções podem ser negligenciados em grande parte pela infecção subclínica e assintomática. Em consequência, dificulta-se a determinação de eventos como a infertilidade e doença inflamatória pélvica (HAGGERTY; TAYLOR, 2011; JENSEN, 2004; KRAUSE et al., 1982).

O reconhecimento de que o HPV é causa necessário do câncer de colo uterino abriu a possibilidade para novas estratégias de prevenção, incluindo a prevenção primária com uso de vacina altamente efetivas e a prevenção secundária com uso de testes altamente sensíveis, o que tem melhorado significativamente a performance de programas de *screening* baseados no teste de Papanicolaou. Técnicas moleculares têm sido consideradas alternativas melhores do que a citologia por conta da sensibilidade e reprodutibilidade em detectar NIC 2 e NIC 3. Apesar disto da reconhecida importância dos testes de DNA para HPV na prevenção do câncer de colo uterino, estes ainda não são uma rotina no Brasil (LORENZI; SYRJÄNEN; LONGATTO-FILHO, 2015).

De forma interessante, observamos no presente estudo que a detecção de HPV no fluido peritoneal foi maior em mulheres do grupo caso (nove pacientes) do que no grupo controle (uma paciente). Estudo realizado por Vestergaard et al., (2010) reportou prevalência de 5,8% das amostras de endométrio eutópico de mulheres com (1/32) e sem endometriose (2/20) e nenhuma amostra positiva nas lesões endométrio ectópico em ambos os grupos. Diferentemente, os resultados do presente estudo foram similares ao descrito por Oppelt et al., (2010). Ambos detectaram HPV em amostras de lesão de endometriose ou peritônio sadio. Detectamos HPV em 3,1% das amostras testadas, enquanto que no estudo alemão 11,3% das lesões foram positivas para HPVs de médio e alto risco. De forma similar, também foi sugerido pelos autores que o fenômeno da menstruação seria a principal causa dos achados. Sugeriu-se ainda que a infecção persistente causada por HPV poderia contribuir para a evolução da malignidade celular localmente.

A microbiota vaginal “normal” de mulheres, baseado no perfil mais recorrente em mulheres saudáveis, é entendida como aquela que contém altas

proporções de *Lactobacillus* sp. Alterações da microbiota normal vaginal podem ocorrer principalmente pelo ciclo menstrual e atividade sexual. Desta maneira, susceptibilidade por infecções no trato genital pode aumentar pela flutuação da microbiota vaginal (GAJER et al., 2012). Neste contexto, ao avaliar o risco de colonização microbiana intrauterina e a ocorrência de endometrite em mulheres com endometriose, Khan et al., (2014) reportaram alta colonização microbiana na cavidade uterina em mulheres com endometriose. Os autores associam o achado ao uso de tratamento com agonistas de GnRH (GnRHa). Cinco grupos microbianos mais prevalentes perfazem a maior parte da microbiota vaginal. Dentre estes, os quatro primeiros são essencialmente formados por *Lactobacillus* sp. (*Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, or *L. jensenii*). O último grupo é composto por altas proporções de organismos anaeróbicos (RAVEL et al., 2011). No presente estudo, o perfil de coinfeção entre os grupos apresentou diferença estatisticamente significativa entre si ($p < 0,05$). O perfil de coinfeção observado nas amostras de swab endocervical e fluido peritoneal mostrou maior diversidade de padrões de coinfeção quando comparado ao grupo controle. Como abordado, anteriormente, o fato da maior parte das mulheres estarem em uso de terapia hormonal pode ter contribuído para a que as mulheres estivessem mais vulneráveis à infecção por diferentes microrganismos simultaneamente (KHAN et al., 2014).

Em mulheres com endometriose, alterações funcionais em células do sistema imune (macrófagos, NK, Linfócitos T citotóxicos e talvez neutrófilos), torna o microambiente peritoneal mais imunotolerante, permitindo o estabelecimento da doença após a menstruação retrógrada. Além disso, a produção de várias citocinas e quimiocinas por diferentes células podem favorecer a progressão da doença em detrimento da prevenção (HERINGTON et al., 2011).

No presente estudo, na dosagem de citocinas no fluido peritoneal dos grupos caso e controle, infectados ou não por *Mollicutes*, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as citocinas IFN- γ , IL-1 β e IL-6. Em concordância com estudo realizado por Bersinger et al., (2012), a dosagem de IL-6 no fluido peritoneal esteve aumentada no grupo caso em comparação ao grupo controle. Além disso, a concentração de IL-6, tanto no fluido peritoneal quando no soro, pode ser usado como um biomarcador, devido

a sua relação positiva com o estágio da doença (MOSBAH; NABIEL; KHASHABA, 2016). O grupo caso quando infectado por *M. genitalium* (EDT + MG) também apresentou alta produção de IL-6 comparado ao grupo controle. Entretanto, a concentração de IL-6 foi menor no grupo caso infectado denotando que *M. genitalium* é capaz de modular a resposta imune nas mulheres com endometriose, diminuindo a produção de IL-6 localmente. McGowin et al., (2012) verificaram que *M. genitalium* provoca alta produção de IL-6 em células A2EN e ShEN101 (humanos) durante a fase aguda (48 h). No entanto, em infecção persistente de até 36 dias, observou-se níveis insignificantes dessa citocina. Resultados semelhantes foram observados por Campos et al., (2015), onde IL-6 apresentava maior em mulheres saudáveis do que em mulheres infectadas por *M. genitalium*.

No presente estudo, a produção de IL-1 β estava aumentada nas mulheres do grupo caso infectadas por MG (EDT + MG), com diferença significativa para o grupo controle e para o grupo caso não infectado ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo caso não infectado (EDT) e o controle (CN) sugerindo que a infecção por *M. genitalium* tenha sido determinante para a maior produção da citocina. Diversos autores reportam maior produção de IL-1 β nas mulheres com endometriose (BERBIC; FRASER, 2011; SIKORA et al., 2011; SIKORA; MIELCZAREK-PALACZ; KONDERA-ANASZ, 2016), no entanto, outros não tem observado diferença na concentração de IL-1 β entre mulheres com e sem endometriose (BARCZ et al., 2012; MOSBAH et al., 2016). A presença ou não de micro-organismo pode ser um dos motivos pelo qual os resultados são discrepantes entre os autores. Da mesma forma que IL-1 β , a produção de IFN- γ foi maior no grupo caso infectado por *M. genitalium* (EDT + MG), reforçando a hipótese de que o microrganismo tenha sido o gatilho para a produção aumentada da citocina nas mulheres com endometriose. Essa característica pode estar relacionada com o padrão molecular associado aos patógenos (PAMPS) presentes no micoplasmas. Os mollicutes possuem grande número de lipoproteínas, chamadas de “lipid-associated membrane proteins” (LAMPs). O reconhecimento das LAMPs pelo sistema imune inato pode induzir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias (GARCIA et al., 1998; KACEROVSKY et al., 2013; VISCARDI, 2014).

Nas amostras de tecido de biópsia, cinco citocinas apresentaram níveis elevados (IFN- γ , IL-18, IL-13, TNF- α e IL-23) no grupo controle infectado com *M. genitalium* (CN + MG) quando comparado ao grupo controle não infectado (CN) ($p < 0,05$). Entre estas citocinas, TNF- α destaca-se pelo papel chave no início da cascata de citocinas na resposta às infecções por *M. genitalium* (HE et al., 2014) e por estar aumentada no fluido peritoneal de mulheres com endometriose (HERINGTON et al., 2011; KRALICKOVA; VETVICKA, 2015). Todavia, no presente estudo, esta citocina não estava aumentada nas pacientes do grupo caso (EDT), apenas nas amostras de tecido do grupo controle infectado. A interleucina 18, por sua vez, reconhecida como um membro da família da IL-1, é entendida como importante reguladora da imunidade inata e adquirida. Esta citocina estava aumentada nas pacientes controle infectadas por *M. genitalium* (CAUCI et al., 2002). De forma similar, estavam as citocinas IL-13, normalmente vinculada a ativação de linfócitos B e monócitos em resposta similar à ativação por IL-4 (PODGAEC et al., 2007) e IL-23. Não houve alta produção das citocinas listadas no grupo caso (EDT) e isso pode ter ocorrido devido o estado de regulação negativa de células do sistema imune nas mulheres com endometriose com menor responsividade aos estímulos das citocinas (HERINGTON et al., 2011).

Na expressão gênica, quando comparadas as amostras de tecido os grupos caso (EDT) e controle (CN), sem infecção por micoplasmas, foi verificada alta expressão de genes ligados à ativação da resposta inflamatória (como Toll-likes – *TLR1*, *TLR2* e *TLR8* – *CASP1*, *IL1R1*, *IL1B* e *CRP*), à ativação de macrófagos (*IFNG*), à ativação do sistema complemento (*APCS*) e à apresentação de antígeno (*CD86*). Estes achados demonstram de forma evidente o processo inflamatório que se estabelece nas lesões de endometriose estudadas. Esse perfil inflamatório no tecido da lesão da endometriose também foi observado por Ahn et al., (2016), onde os autores relacionam como esse perfil sendo fundamental para o processo de proliferação, sobrevivência e diferenciação dessas células. Luo et al., (2015) sugerem que os TLRs podem desempenhar um papel importante na origem e desenvolvimento da endometriose, onde a inflamação promovida induz a secreção de IL-8 (autócrina e parácrina), que permite a invasão e a proliferação do tecido na cavidade peritoneal via sinalização de FAK (Quinase de Adesão Focal). Apesar de não ter

sido observada a expressão gênica em tecido do grupo caso (EDT) e/ou controle (CN) infectados por micoplasmas, é válido ressaltar que *TLR2* esteve em *upregulation* quando comparados os tecidos dos grupos caso e controle sem infecção e essa molécula é reconhecida como o principal componente de ativação da resposta inflamatória para mollicutes (BROWNING et al., 2011). O reconhecimento de *M. genitalium* foi relacionado com a ativação tanto de *TLR2* quanto de *TLR1* (MCGOWIN et al., 2009; SHIMIZU; KIDA; KUWANO, 2008). No entanto, He et al., (2009) observaram que a infecção por *M. genitalium* pode também necessitar da ativação, além de *TLR1* e *TLR2*, de *TLR6* para mediar o processo inflamatório relacionado a essa bactéria.

No entanto, ao avaliar a expressão gênica nas células do fluido, foi observado perfil de *downregulation* de genes ligados à ativação de resposta inflamatória (*NLRP3*), apresentação de antígeno e integrinas (*ITGAM* e *CD80*), fator de ativação de macrófagos (*SLC11A1*), mostrando que existe um perfil de inibição das células recrutadas ao local. Macrófagos, Linfócitos T, B e NK, neutrófilos e células dendríticas são as principais células presentes no fluido peritoneal (KRALICKOVA; VETVICKA, 2015). Este perfil de expressão é condizente com os relatos da literatura de que as diferentes células do sistema imune, sobretudo macrófagos e linfócitos T ativados, são recrutadas, no entanto, essas células são pouco responsivas devido à baixa expressão de receptores essenciais às funções de reconhecimento, apresentação e ativação celular (HERINGTON et al., 2011). No caso de linfócitos, estes efeitos imunossupressores não estão correlacionados com período menstrual e nem com níveis de estradiol, progesterona ou prostaglandina E₂ (OOSTERLYNCK et al., 1993). Esse processo pode estar relacionado à inibição da apoptose. Kang et al., (2014) observaram que o aumento na concentração de IL-6 no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, diminui a atividade citolítica de células NK pela *downregulation* de grânulo, sendo esse papel regulado pela expressão de SHP-2 (tirosino-fosfatase Shp2). Além disso, na endometriose, apesar de haver aumento no número de macrófagos recrutados, esses são não responsivos, principalmente devido à inibição de ICAM-1. Isto pode levar à imunotolerância ao tecido implantado (MAEDA, et al., 2002). De forma bastante interessante, esse perfil é acentuado com a presença de *M. genitalium*. Na análise de expressão gênica em células do fluido com *M. genitalium* foi percebida

acentuada *downregulation* de genes ligados à ativação de resposta inflamatória (*TYK2*, *STAT1*, *CD14*), ativação de resposta TH1 (*TBX21*), ativação de resposta TH2 (*IL5*), além da apresentação de antígeno (*HLA-A*, *CD86*). Além disso, ao agruparmos todos os micoplasmas e comparamos a expressão gênica nas células do fluido peritoneal do grupo caso infectado com micoplasmas; com o grupo controle sem micoplasmas, de forma geral, os mesmos tipos de genes estavam em *downregulation* (*TBX21*, *MAPK8*, *IRAK1* – receptor de IL-1, *IFNGR1* – receptor de INFG; e *HLA-A* e *CDA4* – reconhecimento do MHC). Não se sabe ao certo, de que maneira esses micro-organismos são capazes de induzir essa imunotolerância; no entanto, alguns micoplasmas, como *M. genitalium*, são capazes de persistir no hospedeiro por mecanismos de imunomodulação (BROWNING et al., 2011). *M. genitalium* é capaz de sobreviver durante longos períodos de infecção, independente da ativação de resposta inflamatórias crônicas. No entanto esse mecanismo ainda é desconhecido (MCGOWIN et al., 2012). Em contrapartida, quando o microrganismo detectado nas amostras de fluido foi *M. hominis*, ocorreu um perfil inverso de expressão com acentuada *upregulation* de diferentes genes (*STAT6*, *MAPK1*, *IRF3* e *GATA3*) de forma significativa ($p < 0,05$). O gene *GATA3* foi descrito como uma molécula que sofre influência direta do hormônio estrógeno e pode promover a ocorrência e desenvolvimento da endometriose por meio da regulação da secreção de citocinas (IL-6, IL-10 e IL-8) em células do endométrio eutópico de pacientes com endometriose (CHEN; WANG; LIANG, 2016). Da mesma maneira, ainda é incerto o papel imunomodulatório de *M. hominis* (HASEBE; MU; COLE, 2014).

Diante dos resultados obtidos, propõe-se que a endometriose, independente da presença de *Mollicutes*, é capaz de induzir a secreção de citocinas inflamatórias no fluido peritoneal, levando a um ambiente pró-inflamatório. O estado inflamatório gerado induz o recrutamento de células do sistema imune. Contudo, essas não são funcionais, o que leva a uma tolerância ao tecido implantado. A presença de micoplasmas, em especial *M. genitalium*, no fluido peritoneal, pode desempenhar um papel chave na manutenção desse processo de imunotolerância e, principalmente, no agravamento desse perfil. No entanto, mais estudos são necessários para compreender essa imunotolerância frente às infecções bacterianas. Os dados obtidos no presente estudo são inéditos e importantes para favorecer a discussão quanto à importância e

relevância que as espécies de micoplasmas e outros microrganismos de importância clínica ginecológica podem representar na saúde sexual e reprodutiva da mulher.

7 CONCLUSÕES

- Mulheres com alto grau de instrução ($\geq$ ensino superior completo) compuseram o perfil estatisticamente mais associado à endometriose.
- Os sintomas dismenorreia e dispareunia apresentaram estatisticamente maior severidade ($EAD \geq 7$) nas mulheres com endometriose. Além destes, infertilidade foi outra queixa estatisticamente mais frequente nas mulheres com endometriose.
- Espécies de *Mollicutes* (*M. genitalium*, *M. hominis* e *U. urealyticum*) e HPV podem ser detectadas por meio da qPCR em amostras clínicas obtidas da cavidade peritoneal de mulheres com endometriose.
- As mulheres com endometriose apresentaram maior diversidade de microrganismos detectados nas amostras e fluido peritoneal (*M. genitalium*, *M. hominis* e *U. urealyticum*) e tecido de biópsia (*M. genitalium*, *M. hominis* e HPV) quando comparado ao grupo controle.
- A prevalência dos microrganismos detectados (*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e HPV) nas amostras de *swab* endocervical e fluido peritoneal foi maior nas mulheres com endometriose que nas mulheres controle. Nas amostras de tecido, a prevalência de *M. genitalium* e *M. hominis* foi maior dentre as mulheres com endometriose.
- A menstruação retrógrada pode explicar, em parte, a tendência decrescente da prevalência dos microrganismos detectados nas amostras clínicas na ordem *Swab* > Fluido peritoneal > Tecido de biópsia, nos grupos caso e controle.
- A detecção de *U. parvum* nas amostras de *swab* endocervical foi associada estatisticamente com a maior severidade do sintoma dispareunia.
- A detecção de *M. genitalium* no fluido peritoneal de mulheres com endometriose foi associada à maior produção de IFN- γ e IL-1 β , quando comparado aos grupos caso e controle sem este micoplasma.
- A maior produção de IL-6 no fluido peritoneal foi associada às mulheres com endometriose com ou sem *M. genitalium*.

- A infecção por *M. genitalium* foi associada à maior produção das citocinas IFN- γ , IL-18, IL-13, TNF- α e IL-23 no tecido de biópsia do grupo controle, quando comparado ao grupo controle não infectado.
- Houve aumento na produção de TNF- α no tecido de biópsia de mulheres com endometriose e *M. genitalium* e não nas mulheres do grupo caso sem infecção.
- Houve alta expressão de genes ligados à ativação da resposta inflamatória, ativação de macrófagos, do sistema complemento e apresentação de antígeno nas lesões de endometriose não infectadas com micoplasmas.
- Não houve diferença entre a expressão gênica de genes ligados à resposta imune à inflamação nas lesões de endometriose de mulheres com ou sem *M. genitalium*.
- Nas células presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose sem infecção foi observado perfil de *downregulation* de genes ligados à resposta inflamatória, apresentação de antígenos, fator de ativação de macrófagos, o que pode estar ligado à imunotolerância ao tecido implantado.
- O perfil de *downregulation* de genes da inflamação e resposta imune, nas células presentes no fluido peritoneal, foi acentuado pela presença de *M. genitalium* ou qualquer micoplasma. No entanto, na presença de *M. hominis* foi observado um perfil contrário.
- Células do fluido peritoneal de mulheres com endometriose, infectadas por qualquer micoplasma, apresentaram prevalência do perfil de *downregulation* dos genes ligados à resposta imune inflamatória comparado ao grupo controle sem infecção.
- A presença de micoplasmas, em especial *M. genitalium*, no fluido peritoneal, pode desempenhar papel chave na manutenção do processo de imunotolerância, principalmente pelo agravamento desse perfil.

REFERENCIAS*

ABELE-HORN, M.; WOLFF, C.; DRESSEL, P.; ZIMMERMANN, A.; VAHLENSIECK, W.; PFAFF, F.; RUCKDESCHEL, G. Polymerase chain reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, n. 7, p. 595-598, 1996.

ABRAO, M. S.; GONCALVES, M. O.; DIAS, J. A., JR.; PODGAEC, S.; CHAMIE, L. P.; BLASBALG, R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. **Hum. Reprod.**, v. 22, n. 12, p. 3092-3097, 2007.

ABRAO, M. S.; NEME, R. M.; CARVALHO, F. M.; ALDRIGHI, J. M.; PINOTTI, J. A. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 82, n. 1, p. 31-40, 2003.

ACIEN, P.; VELASCO, I. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. **ISRN Obstet. Gynecol.**, v. 2013, p. 1 - 12, 2013.

AHN, S. H.; KHALAJ, K.; YOUNG, S. L.; LESSEY, B. A.; KOTI, M.; TAYADE, C. Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. **Fertil. Steril.**, 2016. [in press].

AMIRMOZAFARI, N.; MIRNEJAD, R.; KAZEMI, B.; SARIRI, E.; BOJARI, M. R.; DARKAHI, F. D. Comparison of polymerase chain reaction and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. **Saudi. Med. J.**, v. 30, n. 11, p. 1401-1405, 2009.

ANDERSEN, B.; SOKOLOWSKI, I.; OSTERGAARD, L.; KJOLSETH MOLLER, J.; OLESEN, F.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioural risk factors in the general population. **Sex. Transm. Infect.**, v. 83, n. 3, p. 237-241, 2007.

ASHSHI, A. M.; BATWA, S. A.; KUTBI, S. Y.; MALIBARY, F. A.; BATWA, M.; REFAAT, B. Prevalence of 7 sexually transmitted organisms by multiplex real-time PCR in Fallopian tube specimens collected from Saudi women with and without ectopic pregnancy. **BMC Infect. Dis.**, v. 15, n. 569, p. 1-11, 2015.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASTRAUSKIENE, D.; GRISKEVICIUS, A.; LUKSIENE, R.; PANAVIENE, V.; VENALIENE, J. *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in sexually intact girls with arthritides. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 41, n. 4, p. 275-279, 2012.

AUGOULEA, A.; ALEXANDROU, A.; CREATSA, M.; VRACHNIS, N.; LAMBRINOUDAKI, I. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 286, n. 1, p. 99-103, 2012.

AVELAR, G. S.; BERTÃO, S. A. S.; PÁDUA, R. A. F.; CARDOSO, R. F.; SIQUEIRA, V. L. D. *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. em amostras do trato genitourinário e sua relação com sintomas de infecção genital. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 39, n. 4, p. 295-298, 2007

AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. E. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Rev. Saúde Públ.**, v. 44, p. 963-974, 2010.

BACZYNSKA, A.; FUNCH, P.; FEDDER, J.; KNUDSEN, H. J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*--in vitro organ culture study. **Hum. Reprod.**, v. 22, n. 4, p. 968-979, 2007.

BAKA, S.; KOUSKOUNI, E.; ANTONOPOULOU, S.; SIOUTIS, D.; PAPAKONSTANTINO, M.; HASSIAKOS, D.; LOGOTHETIS, E.; LIAPIS, A. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with chronic urinary symptoms. **Urology**, v. 74, n. 1, p. 62-66, 2009.

BALABANOV, D. N.; RAKOVSKAIA, I. V.; GORINA, L. G.; GONCHAROVA, S. A.; GAMOVA, N. A.; BARKHATOVA, O. I. The comparison of mycoplasma detection methods in the urogenital tract infection. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, n. 4, p. 82-85, 2006.

BAO, T.; CHEN, R.; ZHANG, J.; LI, D.; GUO, Y.; LIANG, P.; YAN, Z. Simultaneous detection of *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* by fluorescence polarization. **J. Biotechnol.**, v. 150, n. 1, p. 41-43, 2010.

BARCZ, E.; MILEWSKI, L.; DZIUNYCZ, P.; KAMINSKI, P.; PLOSKI, R.; MALEJCZYK, J. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. **Fertil. Steril.**, v. 97, n. 6, p. 1380-1386, 2012.

BASEMAN, J. B.; LANGE, M.; CRISCIMAGNA, N. L.; GIRON, J. A.; THOMAS, C. A. Interplay between mycoplasmas and host target cells. **Microb. Pathog.**, v. 19, n. 2, p. 105-116, 1995.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997.

BELLELIS, P.; DIAS, J. A., JR.; PODGAEC, S.; GONZALES, M.; BARACAT, E. C.; ABRAO, M. S. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis-a case series. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 4, p. 467-471, 2010.

BELLELIS, P.; PODGAEC, S.; ABRAO, M. S. Environmental factors and endometriosis. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, n. 4, p. 448-452, 2011.

_____. Environmental factors and endometriosis: a point of view. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 36, n. 10, p. 433-435, 2014.

BERBIC, M.; FRASER, I. S. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. **J. Reprod. Immunol.**, v. 88, n. 2, p. 149-155, 2011.

BERGEY'S. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (*Mollicutes*), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: _____. 2. ed. **Manual of Systematic Bacteriology** New York: Springer-Verlag, 2010. v.4. 721 p.

BERLE, L. M.; FIRSOVA, N.; KALASHNIK, A.; PROTASOVA, V. M.; PONOMAREVA, Z. V.; GUBERNICKAYA, S. V.; KUDRINA, T. I.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S. O.; SKOGEN, V. *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in clinical and non-clinical settings, Arkhangelsk Oblast, Russia. **Int. J. STD. AIDS.**, v. 23, n. 11, p. 781-784, 2012.

BERSINGER, N. A.; DECHAUD, H.; MCKINNON, B.; MUELLER, M. D. Analysis of cytokines in the peritoneal fluid of endometriosis patients as a function of the menstrual cycle stage using the Bio-Plex(R) platform. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 118, n. 4, p. 210-218, 2012.

BHALLA, P.; BAVEJA, U. K.; CHAWLA, R.; SAINI, S.; KHAKI, P.; BHALLA, K.; MAHAJAN, S.; REDDY, B. S. Simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* by PCR in genitourinary specimens from men and women attending an STD clinic. **J. Commun. Dis.**, v. 39, n. 1, p. 1-6, 2007.

BIERNAT-SUDOLSKA, M.; SZOSTEK, S.; ROJEK-ZAKRZEWSKA, D.; KLIMEK, M.; KOSZ-VNENCHAK, M. Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology. **Adv. Med. Sci.**, v. 56, n. 2, p. 299-303, 2011.

BIGNELL, C.; UNEMO, M.; EUROPEAN, S. T. I. G. E. B. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **Int. J. STD AIDS**, v. 24, n. 2, p. 85-92, 2013.

BLANCHARD, A. *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. **Mol. Microbiol.**, v. 4, n. 4, p. 669-676, 1990.

BOCCARDO, E.; MANZINI BALDI, C. V.; CARVALHO, A. F.; RABACHINI, T.; TORRES, C.; BARRETA, L. A.; BRENTANI, H.; VILLA, L. L. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 3, p. 521-531, 2010.

BOCCARDO, E.; NOYA, F.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T.; VILLA, L. L. HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. **Virology**, v. 328, n. 2, p. 233-243, 2004.

BOVÉ, J. M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumonia microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. **Res. Microbiol.**, v. 150, n. 4, p. 239-245, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2006. 56 p.

BROWN, D. R.; WHITCOMB, R. F.; BRADBURY, J. M. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, n. 11, p. 2703-2719, 2007.

BROWNING, G. F.; MARENDIA, M. S.; NOORMOHAMMADI, A. H.; MARKHAM, P. F. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. **Vet. Microbiol.**, v. 153, n. 1-2, p. 44-50, 2011.

BUIM, M. R.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C.; METTIFOGO, E.; UENO, P. M.; TIMENETSKY, J.; SANTELLI, G. M.; FERREIRA, A. J. *Mycoplasma synoviae* cell invasion: elucidation of the Mycoplasma pathogenesis in chicken. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, n. 1, p. 41-47, 2011.

BULLETTI, C.; COCCIA, M. E.; BATTISTONI, S.; BORINI, A. Endometriosis and infertility. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 27, n. 8, p. 441-447, 2010.

BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 98, n. 3, p. 1-19, 2012.

BUSOLO, F.; BARATTO, T.; BERTOLONI, G.; GROSSATO, A. Survival of genital mycoplasma on various bacteriological swabs and transport media. **Boll Ist Sieroter Milan**, v. 60, n. 1, p. 31-40, 1981.

CAMPOS, E. A.; SIMÕES, J. A.; RABELO-SANTOS, S. H.; SARIAN, L. O.; PITTA, D. R.; LEVI, J. E.; DERCHAIN, S. Recovery of DNA for the detection and genotyping of human papillomavirus from clinical cervical specimens stored for up to 2 years in a universal collection medium with denaturing reagent. **J. Virol. Methods**, v. 147, n. 2, p. 333-337, 2008.

CAMPOS, G. B.; LOBAO, T. N.; SELIS, N. N.; AMORIM, A. T.; MARTINS, H. B.; BARBOSA, M. S.; OLIVEIRA, T. H.; DOS SANTOS, D. B.; FIGUEIREDO, T. B.; MIRANDA MARQUES, L.; TIMENETSKY, J. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in urogenital tract of Brazilian women. **BMC Infect. Dis.**, v. 15, n. 60, p. 1-8, 2015.

CAO, X.; WANG, Y.; HU, X.; QING, H.; WANG, H. Real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for quantitative detection and differentiation of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 4, p. 373-378, 2007.

CAUCI, S.; DRIUSSI, S.; GUASCHINO, S.; ISOLA, M.; QUADRIFOGLIO, F. Correlation of local interleukin-1beta levels with specific IgA response against *Gardnerella vaginalis* cytotoxin in women with bacterial vaginosis. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 47, n. 5, p. 257-264, 2002.

CHANG, H. Y.; PRINCE, O. A.; SHEPPARD, E. S.; KRAUSE, D. C. Processing is required for a fully functional protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* gliding and cytoadherence. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 20, p. 5841-5846, 2011.

CHAPRON, C.; SANTULLI, P.; DE ZIEGLER, D.; NOEL, J. C.; ANAF, V.; STREULI, I.; FOULOT, H.; SOUZA, C.; BORGHESE, B. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. **Hum. Reprod.**, v. 27, n. 702-711, 2012.

CHEN, P.; WANG, D. B.; LIANG, Y. M. Evaluation of estrogen in endometriosis patients: Regulation of GATA-3 in endometrial cells and effects on Th2 cytokines. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 42, n. 6, p. 669-677, 2016.

CHEN, X. S.; YIN, Y. P.; LIANG, G. J.; WANG, Q. Q.; JIANG, N.; LIU, Q.; FU, G. F.; YANG, B.; ZHOU, Y. J.; SHI, M. Q.; WANG, B. X. The prevalences of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections among female sex workers in China. **Bmc Public Health**, v. 13, n.121, p. 1-5, 2013.

COX, C.; WATT, A. P.; MCKENNA, J. P.; COYLE, P. V. *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella vaginalis* display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, n. 3, p. 481-487, 2016.

CRAMER, D. W.; MISSMER, S. A. The epidemiology of endometriosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 955, p. 11-22, 2002.

CUNNINGHAM, S. A.; MANDREKAR, J. N.; ROSENBLATT, J. E.; PATEL, R. Rapid PCR Detection of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. **Int. J. Bacteriol.**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

DE FRANCESCO, M. A.; NEGRINI, R.; PINSI, G.; PERONI, L.; MANCA, N. Detection of *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, n. 6, p. 641-646, 2009.

DEB, K.; CHATTURVEDI, M. M.; JAISWAL, Y. K. Gram-negative bacterial endotoxin-induced infertility: a birds eye view. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 57, n. 4, p. 224-232, 2004.

DE SILVA, N. S.; QUINN, P. A. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 201, n. 1-2, p. 159-167, 1999.

DIAS, J. A., JR.; PODGAEC, S.; DE OLIVEIRA, R. M.; CARNEVALE MARIN, M. L.; BARACAT, E. C.; ABRAO, M. S. Patients with endometriosis of the rectosigmoid have a higher percentage of natural killer cells in peripheral blood. **J. Minim. Invasive. Gynecol.**, v. 19, n. 3, p. 317-324, 2012.

DIENES, L. L. Organisms of Klieneberger and *Streptobacillus moniliformis*. **J. Infect. Dis.**, v. 65, n. 1, p. 24-42, 1939.

DIENES, L.; EDSALL, G. Observations on the L-Organism of Klieneberger. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 36, n. 5, p. 740-744, 1937.

DOH, K.; BARTON, P. T.; KORNEEVA, I.; PERNI, S. C.; BONGIOVANNI, A. M.; TUTTLE, S. L.; SKUPSKI, D. W.; WITKIN, S. S. Differential vaginal expression of interleukin-1 system cytokines in the presence of *Mycoplasma hominis* and

Ureaplasma urealyticum in pregnant women. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 12, n. 2, p. 79-85, 2004.

EDWARD, D. G.; FREUNDT, E. A. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. **J. Gen. Microbiol.**, v. 14, n. 1, p. 197-207, 1956.

ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F.; BOVE, J. M. Isolation of *Mycoplasma salivarium* from swine. **Vet. Microbiol.**, v. 16, n. 4, p. 385-390, 1988.

ESKENAZI, B.; WARNER, M. L. Epidemiology of endometriosis. **Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.**, v. 24, n. 2, p. 235-258, 1997.

FAIRBANKS, F.; ABRAO, M. S.; PODGAEC, S.; DIAS, J. A., JR.; DE OLIVEIRA, R. M.; RIZZO, L. V. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 91, n. 2, p. 320-324, 2009.

FALK, L.; FREDLUND, H.; JENSEN, J. S. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, n. 1, p. 73-78, 2005.

FARHADIFAR, F.; KHODABANDEHLOO, M.; RAMAZANZADEH, R.; ROUHI, S.; AHMADI, A.; GHADERI, E.; ROSHANI, D.; SOOFIZADEH, N.; REZZAIL, M. Survey on association between *Mycoplasma hominis* endocervical infection and spontaneous abortion using Polymerase Chain Reaction. **Int. J. Reprod. Biomed (Yazd)**, v. 14, n. 3, p. 181-186, 2016.

FASTRING, D. R.; AMEDEE, A.; GATSKI, M.; CLARK, R. A.; MENA, L. A.; LEVISON, J.; SCHMIDT, N.; RICE, J.; GUSTAT, J.; KISSINGER, P. Co-occurrence of *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis and vaginal shedding of HIV-1 RNA. **Sex. Transm. Dis.**, v. 41, n. 3, p. 173-179, 2014.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, n. 33, p. 5201-5207, 2003.

FERANDON, C.; PEUCHANT, O.; JANIS, C.; BENARD, A.; RENAUDIN, H.; PEREYRE, S.; BEBEAR, C. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 2, p. 155-159, 2011.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K. V.; SANDUSKY, M.

FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT, K. F.; HU, P. C.; LUCIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A., 3RD; VENTER, J. C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 397-403, 1995.

GAJER, P.; BROTMAN, R. M.; BAI, G.; SAKAMOTO, J.; SCHUTTE, U. M.; ZHONG, X.; KOENIG, S. S.; FU, L.; MA, Z. S.; ZHOU, X.; ABDO, Z.; FORNEY, L. J.; RAVEL, J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Sci. Transl. Med.**, v. 4, n. 132, p. 132ra52, May 2 2012.

GALLOWAY, D. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. **Curr. Opin. Virol.**, v. 14, p. 87-92, 2015.

GARCIA, J.; LEMERCIER, B.; ROMAN-ROMAN, S.; RAWADI, G. A Mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 51, p. 34391-34398, 1998.

GAZVANI, R.; COYNE, L.; ANTTILA, T.; SAIKKU, P.; PAAVONEN, J.; TEMPLETON, A. Antibodies to Chlamydia trachomatis in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. **Hum. Fertil. (Camb)**, v. 14, n. 1, p. 64-67, 2011.

GEELEN, T. H.; ROSSEN, J. W.; BEERENS, A. M.; POORT, L.; MORRE, S. A.; RITMEESTER, W. S.; VAN KRUCHTEN, H. E.; VAN DE PAS, M. M.; SAVELKOUL, P. H. Performance of cobas(R) 4800 and m2000 real-time assays for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in rectal and self-collected vaginal specimen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 77, n. 2, p. 101-105, 2013.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789-1799, 2004.

GOULET, M.; DULAR, R.; TULLY, J. G.; BILLOWES, G.; KASATIYA, S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 2823-2825, 1995.

GRAD, Y. H.; GOLDSTEIN, E.; LIPSITCH, M.; WHITE, P. J. Improving Control of Antibiotic-Resistant Gonorrhea by Integrating Research Agendas Across Disciplines: Key Questions Arising From Mathematical Modeling. **J. Infect. Dis.**, v. 213, n. 6, p. 883-890, 2016.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q.; WHEELER, C. M.; COUPLÉE, F.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; SCOTT, D. R.; APPLE, R. J. Improved

amplification of genital human papillomaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GRZESKO, J.; ELIAS, M.; MACZYNSKA, B.; KASPRZYKOWSKA, U.; TLACZALA, M.; GOLUDA, M. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in fertile and infertile women. **Fertil. Steril.**, v. 91, n. 6, p. 2376-2380, 2009.

GUPTA, A.; GUPTA, A.; GUPTA, S.; MITTAL, A.; CHANDRA, P.; GILL, A. K. Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 280, n. 6, p. 981-985, 2009.

GUVEN, M. A.; DILEK, U.; PATA, O.; DILEK, S.; CIRAGIL, P. Prevalance of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections in the unexplained infertile women. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 276, n. 3, p. 219-223, 2007.

GUY, R.; WARD, J.; WAND, H.; RUMBOLD, A.; GARTON, L.; HENGEL, B.; SILVER, B.; TAYLOR-THOMSON, D.; KNOX, J.; MCGREGOR, S.; DYDA, A.; FAIRLEY, C.; MAHER, L.; DONOVAN, B.; KALDOR, J.; ON BEHALF OF THE, S. I. G. Coinfection with *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis*: a cross-sectional analysis of positivity and risk factors in remote Australian Aboriginal communities. **Sex. Transm. Infect.**, v. 91, n. 3, p. 201-206, 2014.

HAGGERTY, C. L.; TAYLOR, B. D. *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of pelvic inflammatory disease. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

HASEBE, A.; MU, H. H.; COLE, B. C. A potential pathogenic factor from *Mycoplasma hominis* is a TLR2-dependent, macrophage-activating, P50-related adhesin. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 72, n. 3, p. 285-295, 2014.

HE, J.; WANG, S.; ZENG, Y.; YOU, X.; MA, X.; WU, N.; WU, Y. Binding of CD14 to *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins upregulates TNF- α . **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 322-330, 2014.

HE, J.; YOU, X.; ZENG, Y.; YU, M.; ZUO, L.; WU, Y. *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins activate NF-kappaB through toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 12, p. 1750-1757, 2009.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, n. 2, p. 83-97, 2006.

HEMMINGS, R.; RIVARD, M.; OLIVE, D. L.; POLIQUIN-FLEURY, J.; GAGNE, D.; HUGO, P.; GOSSELIN, D. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 81, n. 6, p. 1513-1521, 2004.

HERINGTON, J. L.; BRUNER-TRAN, K. L.; LUCAS, J. A.; OSTEEN, K. G. Immune interactions in endometriosis. **Expert Rev. Clin. Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 611-626, 2011.

HOPFE, M.; DEENEN, R.; DEGRANDI, D.; KOHRER, K.; HENRICH, B. Host cell responses to persistent mycoplasmas--different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis*. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. e54219, 2013.

HORNOK, S.; HAJTOS, I.; MELI, M. L.; FARKAS, I.; GONCZI, E.; MEILI, T.; HOFMANN-LEHMANN, R. First molecular identification of *Mycoplasma ovis* and 'Candidatus M. haemoovis' from goat, with lack of haemoplasma PCR-positivity in lice. **Acta. Vet. Hung.**, v. 60, n. 3, p. 355-360, 2012.

HUMBURG, J.; FREI, R.; WIGHT, E.; TROEGER, C. Accuracy of urethral swab and urine analysis for the detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women with lower urinary tract symptoms. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 285, n. 4, p. 1049-1053, 2012.

HUSBY, G. K.; HAUGEN, R. S.; MOEN, M. H. Diagnostic delay in women with pain and endometriosis. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 82, n. 7, p. 649-53, Jul 2003.

IARC. GLOBOCAN 2012 Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. 2012. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> >.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124 ISBN 978-85-7318-237-8.

JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 18, n. 1, p. 1-11, Jan 2004.

JENSEN, J. S.; BLOM, J.; LIND, K. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 75, n. 2, p. 91-98, 1994.

JENSEN, J. S.; ULDUM, S. A.; SØNDERGÅRD-ANDERSEN, J.; VUUST, J.; LIND, K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 46-50, 1991.

JOMBO, G. T.; ENENEBEAKU, M. N. Genital mycoplasma infections among women in an urban community of northern Nigeria: do we need to search for them? **Niger. J. Med.**, v. 17, n. 3, p. 310-316, 2008.

KACEROVSKY, M.; CELEC, P.; VLKOVA, B.; SKOGSTRAND, K.; HOUGAARD, D. M.; COBO, T.; JACOBSSON, B. Amniotic fluid protein profiles of intraamniotic inflammatory response to *Ureaplasma* spp. and other bacteria. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60399, 2013.

KANG, Y. J.; JEUNG, I. C.; PARK, A.; PARK, Y. J.; JUNG, H.; KIM, T. D.; LEE, H. G.; CHOI, I.; YOON, S. R. An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. **Hum. Reprod.**, v. 29, n.10, p. 2176-2189, 2014.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr. Cancer. Drug. Targets.**, v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.

KHAN, K. N.; FUJISHITA, A.; KITAJIMA, M.; HIRAKI, K.; NAKASHIMA, M.; MASUZAKI, H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosisdagger. **Hum. Reprod.**, v. 29, n. 11, p. 2446-2456, 2014.

KHAN, K. N.; FUJISHITA, A.; MASUMOTO, H.; MUTO, H.; KITAJIMA, M.; MASUZAKI, H.; KITAWAKI, J. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 199, p. 69-75, 2016.

KHAN, K. N.; KITAJIMA, M.; HIRAKI, K.; YAMAGUCHI, N.; KATAMINE, S.; MATSUYAMA, T.; NAKASHIMA, M.; FUJISHITA, A.; ISHIMARU, T.; MASUZAKI, H. *Escherichia coli* contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 94, n. 7, p. 2860-2863, 2010.

KHAN, K. N.; KITAJIMA, M.; INOUE, T.; FUJISHITA, A.; NAKASHIMA, M.; MASUZAKI, H. 17beta-estradiol and lipopolysaccharide additively promote pelvic inflammation and growth of endometriosis. **Reprod. Sci.**, v. 22, n. 5, p. 585-594, 2015.

KOBAYASHI, H.; HIGASHIURA, Y.; SHIGETOMI, H.; KAJIHARA, H. Pathogenesis of endometriosis: the role of initial infection and subsequent sterile inflammation (Review). **Mol. Med. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 9-15, 2014.

KODATI, V. L.; GOVINDAN, S.; MOVVA, S.; PONNALA, S.; HASAN, Q. Role of Shigella infection in endometriosis: a novel hypothesis. **Med. Hypotheses**, v. 70, n. 2, p. 239-243, 2008.

KOEDIJK, F. D.; VAN BERGEN, J. E.; DUKERS-MUIJRERS, N. H.; VAN LEEUWEN, A. P.; HOEBE, C. J.; VAN DER SANDE, M. A.; DUTCH, S. T. I. C. The value of testing multiple anatomic sites for gonorrhoea and chlamydia in sexually transmitted infection centres in the Netherlands, 2006-2010. **Int. J. STD AIDS**, v. 23, n. 9, p. 626-631, 2012.

KONG, F.; MA, Z.; JAMES, G.; GORDON, S.; GILBERT, G. L. Molecular genotyping of human *Ureaplasma* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1921-1929, 2000.

KORTE, J. E.; BASEMAN, J. B.; CAGLE, M. P.; HERRERA, C.; PIPER, J. M.; HOLDEN, A. E.; PERDUE, S. T.; CHAMPION, J. D.; SHAIN, R. N. Cervicitis and genitourinary symptoms in women culture positive for *Mycoplasma genitalium*. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 55, n. 4, p. 265-275, 2006.

KOTANI, H.; BUTLER, G. H.; TALLARIDA, D.; CODY, C.; MCGARRITY, G. J. Microbiological cultivation of *Mycoplasma hyorhinis* from cell cultures. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 26, n. 1, p. 91-96, 1990.

KRALICKOVA, M.; VETVICKA, V. Immunological aspects of endometriosis: a review. **Ann. Transl. Med.**, v. 3, n. 11, p. 153-167, 2015.

KRAUSE, D. C.; CHEN, Y. Y. Interaction of *Mycoplasma pneumoniae* with HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 8, p. 2054-2059, 1988.

KRAUSE, D. C.; LEITH, D. K.; WILSON, R. M.; BASEMAN, J. B. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 3, p. 809-817, 1982.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 211-222, 2004.

KYO, S.; INOUE, M.; HAYASAKA, N.; INOUE, T.; YUTSUDO, M.; TANIZAWA, O.; HAKURA, A. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. **Virology**, v. 200, n. 1, p. 130-139, 1994.

LARSEN, B.; GALASK, R. P. Vaginal microbial flora: practical and theoretic relevance. **Obstet. Gynecol.**, v. 55, n. 5 Suppl, p. 100S-113S, May 1980.

LARSEN, B.; HWANG, J. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

LAUFER, M. R.; GOLDSTEIN, D. P. Dysmenorrhea, pelvic pain and the premenstrual syndrome. In: EMANS, S. F.; LAUFER, M. R., et al (Ed.). **Pediatric and adolescent gynecology**. New York: Lippincott, 1998. p.365-410.

LEACH, R. H. The osmotic requirements for growth of Mycoplasma. **J. Gen. Microbiol.**, v. 27, p. 345-354, 1962.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; WANG, R. Y.; PIERCE, P. F.; KOTANI, H.; SHIH, J. W. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. **Lancet**, v. 338, n. 8780, p. 1415-1418, 1991.

LUO, X. Z.; ZHOU, W. J.; TAO, Y.; WANG, X. Q.; LI, D. J. TLR4 Activation Promotes the Secretion of IL-8 Which Enhances the Invasion and Proliferation of Endometrial Stromal Cells in an Autocrine Manner via the FAK Signal Pathway. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 74, n. 6, p. 467-479, 2015.

MAEDA, N.; IZUMIYA, C.; OGURI, H.; KUSUME, T.; YAMAMOTO, Y.; FUKAYA, T. Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis. **Fertil. Steril.**, v. 77, n. 4, p. 679-683, 2002.

MAEDA, S.; DEGUCHI, T.; ISHIKO, H.; MATSUMOTO, T.; NAITO, S.; KUMON, H.; TSUKAMOTO, T.; ONODERA, S.; KAMIDONO, S. Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in patients with non-gonococcal urethritis using polymerase chain reaction-microtiter plate hybridization. **Int. J. Urol.**, v. 11, n. 9, p. 750-754, 2004.

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; BALAKRISHNAN, N.; ROHDE, C. M.; KELLY, C. M.; RAMAIAH, L.; LEACH, M. W.; BREITSCHWERDT, E. B. "Candidatus Mycoplasma haemomacae" and Bartonella quintana bacteremia in cynomolgus monkeys. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 5, p. 1408-1411, 2013.

MANHART, L. E.; CRITCHLOW, C. W.; HOLMES, K. K.; DUTRO, S. M.; ESCHENBACH, D. A.; STEVENS, C. E.; TOTTEN, P. A. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 4, p. 650-657, 2003.

MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1992. 609 p ISBN 1-55581-050-0.

MARQUES, L. M.; UENO, P. M.; BUZINHANI, M.; CORTEZ, B. A.; NETO, R. L.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C.; GUIMARAES, A. M.; MONEZI, T. A.; BRAGA, A. C., JR.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; TIMENETSKY, J. Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells. **BMC Microbiol.**, v. 10, n. 83, p. 1-8, 2010.

MCGOWIN, C. L.; ANNAN, R. S.; QUAYLE, A. J.; GREENE, S. J.; MA, L.; MANCUSO, M. M.; ADEGBOYE, D.; MARTIN, D. H. Persistent *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 11, p. 3842-3849, 2012.

MCGOWIN, C. L.; MA, L.; MARTIN, D. H.; PYLES, R. B. *Mycoplasma genitalium*-encoded MG309 activates NF-kappaB via Toll-like receptors 2 and 6 to elicit proinflammatory cytokine secretion from human genital epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1175-1181, 2009.

MCGOWIN, C. L.; POPOV, V. L.; PYLES, R. B. Intracellular *Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 139, p. 1-11, 2009.

MELIS, G. B.; NERI, M.; CORDA, V.; MALUNE, M. E.; PIRAS, B.; PIRARBA, S.; GUERRIERO, S.; ORRU, M.; D'ALTERIO, M. N.; ANGIONI, S.; PAOLETTI, A. M. Overview of elagolix for the treatment of endometriosis. **Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.**, v. 12, n. 5, p. 581-588, 2016.

MERNAUGH, G. R.; DALLO, S. F.; HOLT, S. C.; BASEMAN, J. B. Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. 69-77, 1993.

MEYER, R. Über den staude der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyometritis sarcomastosa. **Zentralbl. Gynakol.**, v. 36, p. 745-750, 1919.

MICHOU, I. V.; CONSTANTOULAKIS, P.; MAKAROUNIS, K.; GEORGOULIAS, G.; KAPETANIOS, V.; TSILIVAKOS, V. Molecular investigation of menstrual tissue for the presence of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* collected by women with a history of infertility. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 40, n. 1, p. 237-242, 2014.

MILANEZI, F.; FALCONI, A.; SCHNABEL, B.; RICARDI, L. R.; MONFREDINI, P. M.; ZILIOOTTO, A. T.; LOPES, V. F.; MACHADO, S. A.; OLIVEIRA, M. J.; CENTRONE, C. C.; NAKANO, V. Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp. in Routine Gynecological Care in Sao Paulo City, Brazil. **Arch. Clin. Infect. Dis.**, v. 11, n. 3, p. e36668, 2016.

MILES, R.; NICHOLAS, R. **Mycoplasma protocols: Introduction**. Methods Mol. Biol., v. 104. Totowa: Humana Press, 1998. 330 p.

MILES, R. J. Cell nutrition and growth. In: Manilloff, J.; Mcelhaney, R. N.; Finch, L. R.; Baseman, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. P. 23-40.

MISSMER, S. A.; HANKINSON, S. E.; SPIEGELMAN, D.; BARBIERI, R. L.; MARSHALL, L. M.; HUNTER, D. J. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. **Am. J. Epidemiol.**, v. 160, n. 8, p. 784-796, 2004.

MOBLEY, V. L.; HOBBS, M. M.; LAU, K.; WEINBAUM, B. S.; GETMAN, D. K.; SENA, A. C. *Mycoplasma genitalium* infection in women attending a sexually transmitted infection clinic: diagnostic specimen type, coinfections, and predictors. **Sex. Transm. Dis.**, v. 39, n. 9, p. 706-709, 2012.

MOI, H.; REINTON, N.; MOGHADDAM, A. *Mycoplasma genitalium* in women with lower genital tract inflammation. **Sex. Transm. Infect.**, v. 85, n. 1, p. 10-14, 2009.

MOINI, A.; MALEKZADEH, F.; AMIRCHAGHMAGHI, E.; KASHFI, F.; AKHOOND, M. R.; SAEI, M.; MIRBOLOK, M. H. Risk factors associated with endometriosis among infertile Iranian women. **Arch. Med. Sci.**, v. 9, n. 3, p. 506-514, 2013.

MOSBAH, A.; NABIEL, Y.; KHASHABA, E. Interleukin-6, intracellular adhesion molecule-1, and glycodelin A levels in serum and peritoneal fluid as biomarkers for endometriosis. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, 2016. [In press].

MS/INCA. **Falando sobre câncer do colo do útero**: Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev). Rio de Janeiro: MS/INCA, 2002 2002.

MUNOZ, J. L.; GOJE, O. J. *Mycoplasma genitalium*: An Emerging Sexually Transmitted Infection. **Scientifica (Cairo)**, v. 2016, p. 1-5, 2016.

NACUL, A. P.; SPRITZER, P. M. [Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis]. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 32, n. 6, p. 298-307, 2010.

NOCARD; ROUX. The microbe of pleuropneumonia. 1896. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 354-358, 1990.

OLOVSSON, M. Immunological aspects of endometriosis: an update. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 66, p. 101-104, 2011.

OLSEN, B.; LAN, P. T.; STALSBY LUNDBORG, C.; KHANG, T. H.; UNEMO, M. Population-based assessment of *Mycoplasma genitalium* in Vietnam--low prevalence among married women of reproductive age in a rural area. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 23, n. 5, p. 533-537, 2009.

OLSON, L. D.; RENSHAW, C. A.; ROTTEM, S.; BOAL, J. H. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolism: a ¹³C-NMR study. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 108, n. 1, p. 47-52, 1993.

OOSTERLYNCK, D. J.; MEULEMAN, C.; WAER, M.; KONINCKX, P. R.; VANDEPUTTE, M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. **Obstet. Gynecol.**, v. 82, n. 2, p. 206-212, 1993.

OPPELT, P.; RENNER, S. P.; STRICK, R.; VALLETTA, D.; MEHLHORN, G.; FASCHING, P. A.; BECKMANN, M. W.; STRISSEL, P. L. Correlation of high-risk human papilloma viruses but not of herpes viruses or *Chlamydia trachomatis* with endometriosis lesions. **Fertil. Steril.**, v. 93, n. 6, p. 1778-1786, 2010.

OSUGA, Y.; KOGA, K.; HIROTA, Y.; HIRATA, T.; YOSHINO, O.; TAKETANI, Y. Lymphocytes in endometriosis. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 65, n. 1, p. 1-10, 2011.

OZKAN, S.; MURK, W.; ARICI, A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1127, p. 92-100, 2008.

PARAZZINI, F.; ESPOSITO, G.; TOZZI, L.; NOLI, S.; BIANCHI, S. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, 2016.

PATEL, M. A.; NYIRJESY, P. Role of Mycoplasma and ureaplasma species in female lower genital tract infections. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 12, n. 6, p. 417-422, 2010.

PELTIER, M. R.; FREEMAN, A. J.; MU, H. H.; COLE, B. C. Characterization of the macrophage-stimulating activity from *Ureaplasma urealyticum*. **Amer. Journ. Reprod. Immun.**, v. 57, n. 3, p. 186-192, Mar 2007.

PEREYRE, S.; SIRAND-PUGNET, P.; BEVEN, L.; CHARRON, A.; RENAUDIN, H.; BARRE, A.; AVENAUD, P.; JACOB, D.; COULOUX, A.; BARBE, V.; DE DARUVAR, A.; BLANCHARD, A.; BEBEAR, C. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. **Plos Genet.**, v. 5, n. 10, p. e1000677, 2009.

PERRY, P. A.; KASPER, C. E. Challenges facing research scientists. **Biol. Res. Nurs.**, v. 2, n. 1, p. 3-4, 2000.

PERRY, R. Endometriosis: a gynecological and colorectal disease. **New Zealand Med. Journ.**, v. 118, p. 1535-1539, 2005.

PODGAEC, S.; ABRAO, M. S.; DIAS, J. A., JR.; RIZZO, L. V.; DE OLIVEIRA, R. M.; BARACAT, E. C. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. **Hum. Reprod.**, v. 22, n. 5, p. 1373-1379, 2007.

PODGAEC, S.; DIAS JUNIOR, J. A.; CHAPRON, C.; OLIVEIRA, R. M.; BARACAT, E. C.; ABRAO, M. S. Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 1, p. 92-98, 2010.

POLLACK, J. D.; JONES, M. A.; WILLIAMS, M. V. The metabolism of AIDS-associated mycoplasmas. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. 267-271, 1993.

POVLSEN, K.; THORSEN, P.; LIND, I. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovars to the presence or absence of bacterial vaginosis in pregnant women and to the time of delivery. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, n. 1, p. 65-67, 2001.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G. M.; KOENIG, S. S.; MCCULLE, S. L.; KARLEBACH, S.; GORLE, R.; RUSSELL, J.; TACKET, C. O.; BROTMAN, R. M.; DAVIS, C. C.; AULT, K.; PERALTA, L.; FORNEY, L. J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 108 Suppl 1, p. 4680-4687, 2011.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 42, n. 2, p. 414-470, 1978.

_____. The Emmy Klieneberger-Nobel award lecture. Appealing attributes of mycoplasmas in cell biology research. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 23, n. 5, p. 318-325, 1987.

_____. The minimal cellular genome of mycoplasma. **Indian J Biochem Biophys**, v. 34, n. 1-2, p. 124-130, 1997.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Methods in Mycoplasmology: Mycoplasmas Characterization**. New York: Academic Press, 1983. v.1, 54 p.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RIAZI, H.; TEHRANIAN, N.; ZIAEI, S.; MOHAMMADI, E.; HAJIZADEH, E.; MONTAZERI, A. Clinical diagnosis of pelvic endometriosis: a scoping review. **BMC Womens Health**, v. 15, v. 39, p. 1-10, 2015.

ROBERTSON, J. A.; STEMKE, G. W.; DAVIS, J. W.; HARASAWA, R.; THIRKELL, D.; KONG, F.; SHEPARD, M. C.; FORD, D. K. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 587-597, 2002.

RODRIGUES, M. M.; FERNANDES, P. A.; HADDAD, J. P.; PAIVA, M. C.; SOUZA MDO, C.; ANDRADE, T. C.; FERNANDES, A. P. Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in cervical samples. **J. Obstet. Gynaecol.**, v. 31, n. 3, p. 237-241, 2011.

ROSENGARTEN, R.; CITTI, C.; GLEW, M.; LISCHEWSKI, A.; DROESSE, M.; MUCH, P.; WINNER, F.; BRANK, M.; SPERGSE, J. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, n. 1, p. 15-25, 2000.

ROSS, J. D.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium* as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. **Sex. Transm. Infect.**, v. 82, n. 4, p. 269-271, 2006.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol. Rev.**, v. 83, n. 2, p. 417-432, 2003.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends. Microbiol.**, v. 6, n. 11, p. 436-440, 1998.

RUHNKE, H. L.; ROSENDAL, S. Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F., et al (Ed.). **Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas**. Iowa: Iowa State University 1994. cap. 141-144,

SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 14, p. 422-469, 1927.

SANTOS, T. M.; PEREIRA, A. M.; LOPES, R. G.; DEPES, D. B. Tempo transcorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico de endometriose. **Einstein**, v. 10, n. 1, p. 39-43, 2012.

SETHI, S.; SINGH, G.; SAMANTA, P.; SHARMA, M. *Mycoplasma genitalium*: an emerging sexually transmitted pathogen. **Indian. J. Med. Res.**, v. 136, n. 6, p. 942-955, 2012.

SHIMIZU, T.; KIDA, Y.; KUWANO, K. A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF-kappaB through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 8, p. 3672-3678, 2008.

SHORT, V. L.; TOTTEN, P. A.; NESS, R. B.; ASTETE, S. G.; KELSEY, S. F.; MURRAY, P.; HAGGERTY, C. L. The demographic, sexual health and behavioural correlates of *Mycoplasma genitalium* infection among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease. **Sex. Transm. Infect.**, v. 86, n. 1, p. 29-31, 2010.

SIGNORILE, P. G.; BALDI, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 42, n. 6, p. 778-780, 2010.

SIKORA, J.; MIELCZAREK-PALACZ, A.; KONDERA-ANASZ, Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 2, p. 200-208, 2011.

_____. Association of the Precursor of Interleukin-1beta and Peritoneal Inflammation-Role in Pathogenesis of Endometriosis. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 28, p. 1-7, 2016.

SIQUEIRA, F. M.; THOMPSON, C. E.; VIRGINIO, V. G.; GONCHOROSKI, T.; REOLON, L.; ALMEIDA, L. G.; DA FONSECA, M. M.; DE SOUZA, R.; PROSDOCIMI, F.; SCHRANK, I. S.; FERREIRA, H. B.; DE VASCONCELOS, A. T.; ZAHA, A. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. **BMC Genomics**, v. 14, p. 175, 2013.

SNIJDERS, P. J.; VAN DEN BRULE, A. J.; SCHRIJNEMAKERS, H. F.; SNOW, G.; MEIJER, C. J.; WALBOOMERS, J. M. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 173-181, 1990.

SONAWANE, G. G.; TRIPATHI, B. N. Comparison of a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with conventional PCR, bacterial culture and ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in sheep showing pathology of Johne's disease. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2013.

SONNENBERG, P.; ISON, C. A.; CLIFTON, S.; FIELD, N.; TANTON, C.; SOLDAN, K.; BEDDOWS, S.; ALEXANDER, S.; KHANOM, R.; SAUNDERS, P.; COPAS, A. J.; WELLINGS, K.; MERCER, C. H.; JOHNSON, A. M. Epidemiology of *Mycoplasma genitalium* in British men and women aged 16-44 years: evidence from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). **Int. J. Epidemiol.**, v. 44, n. 6, p. 1982-1994, 2015.

STEFANSSON, H.; GEIRSSON, R. T.; STEINTHORSDOTTIR, V.; JONSSON, H.; MANOLESCU, A.; KONG, A.; INGADOTTIR, G.; GULCHER, J.; STEFANSSON, K. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. **Hum. Reprod.**, v. 17, n. 3, p. 555-559, 2002.

SUN, X.; JONES, H. P.; DOBBS, N.; BODHANKAR, S.; SIMECKA, J. W. Dendritic cells are the major antigen presenting cells in inflammatory lesions of murine *Mycoplasma* respiratory disease. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55984, 2013.

SUNG, T. J. Ureaplasma infections in pre-term infants: Recent information regarding the role of Ureaplasma species as neonatal pathogens. **Korean J. Pediatr.**, v. 53, n. 12, p. 989-993, 2010.

TAYLOR-ROBINSON, D.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 3, p. 498-514, 2011.

TAYLOR-ROBINSON, D.; JENSEN, J. S.; SVENSTRUP, H.; STACEY, C. M. Difficulties experienced in defining the microbial cause of pelvic inflammatory disease. **Int. J. STD AIDS**, v. 23, n. 1, p. 18-24, 2012.

TAYLOR-ROBINSON, D.; TULLY, J. G.; FURR, P. M.; COLE, R. M.; ROSE, D. L.; HANNA, N. F. Urogenital mycoplasma infections of man: a review with observations on a recently discovered mycoplasma. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 17, n. 7, p. 524-530, 1981.

TENG, L. J.; ZHENG, X.; GLASS, J. I.; WATSON, H. L.; TSAI, J.; CASSELL, G. H. *Ureaplasma urealyticum* biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 6, p. 1464-9, Jun 1994.

THANAWONGNUWECH, R.; YOUNG, T. F.; THACKER, B. J.; THACKER, E. L. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, n. 1-2, p. 115-27, May 10 2001.

THOMS, H. Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. **Yale J. Biol. Med.**, v. 15, n. 6, p. 924-924, 1943.

TULLY, J. **Methods in Mycoplasmology V2: Diagnostic Mycoplasmology**. New York: Elsevier Science, 1983. 464 p.

TULLY, J. G. Current status of the mollicute flora of humans. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. 2-9, 1993.

UENO, P. M.; TIMENETSKY, J.; CENTONZE, V. E.; WEWER, J. J.; CAGLE, M.; STEIN, M. A.; KRISHNAN, M.; BASEMAN, J. B. Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 10, p. 3033-3041, 2008.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 3, p. 587-613, 2014.

VERTERAMO, R.; PATELLA, A.; CALZOLARI, E.; RECINE, N.; MARCONE, V.; OSBORN, J.; CHIARINI, F.; DEGENER, A. M. An epidemiological survey of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in gynaecological outpatients, Rome, Italy. **Epidemiol. Infect.**, v. 141, n. 12, p. 2650-2657, 2013.

VESTERGAARD, A. L.; KNUDSEN, U. B.; MUNK, T.; ROSBACH, H.; BIALASIEWICZ, S.; SLOOTS, T. P.; MARTENSEN, P. M.; ANTONSSON, A. Low prevalence of DNA viruses in the human endometrium and endometriosis. **Arch. Virol.**, v. 155, n. 5, p. 695-703, 2010.

VINATIER, D.; ORAZI, G.; COSSON, M.; DUFOUR, P. Theories of endometriosis. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 96, n. 1, p. 21-34, 2001.

VISCARDI, R. M. Ureaplasma species: role in neonatal morbidities and outcomes. **Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.**, v. 99, n. 1, p. 87-92, 2014.

WAITES, K. B.; CROUSE, D. T.; CASSELL, G. H. Therapeutic considerations for Ureaplasma urealyticum infections in neonates. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. 208-214, 1993.

WAITES, K. B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 4, p. 757-789, 2005.

WAITES, K. B.; SCHELONKA, R. L.; XIAO, L.; GRIGSBY, P. L.; NOVY, M. J. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, v. 14, n. 4, p. 190-199, 2009.

WALKER, J.; FAIRLEY, C. K.; BRADSHAW, C. S.; TABRIZI, S. N.; CHEN, M. Y.; TWIN, J.; TAYLOR, N.; DONOVAN, B.; KALDOR, J. K.; MCNAMEE, K.; URBAN, E.; WALKER, S.; CURRIE, M.; BIRDEN, H.; BOWDEN, F.; GUNN, J.; PIROTTA, M.; GURRIN, L.; HARINDRA, V.; GARLAND, S.; HOCKING, J. S. The difference in determinants of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* in a sample of young Australian women. **BMC Infect. Dis.**, v. 11, p. 1-9, 2011.

WEINSTEIN, S. A.; STILES, B. G. A review of the epidemiology, diagnosis and evidence-based management of *Mycoplasma genitalium*. **Sex. Health**, v. 8, n. 2, p. 143-158, 2011.

WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Switzerland: World Health Organization, 2014.

WIESNER, P. J.; THOMPSON, S. E., 3RD. Gonococcal diseases. **Dis. Mon.**, v. 26, n. 5, p. 1-44, 1980.

WIRA, C. R.; FAHEY, J. V.; SENTMAN, C. L.; PIOLI, P. A.; SHEN, L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. **Immunol. Rev.**, v. 206, p. 306-335, 2005.

WOOLARD, M. D.; HUDIG, D.; TABOR, L.; IVEY, J. A.; SIMECKA, J. W. NK cells in gamma-interferon-deficient mice suppress lung innate immunity against *Mycoplasma* spp. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 10, p. 6742-6751, 2005.

WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A.; CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR Recomm. Rep.**, v. 64, n. 3, p. 1-137, 2015.

WU, Y.; QIU, H.; ZENG, Y.; YOU, X.; DENG, Z.; YU, M.; ZHU, C. *Mycoplasma genitalium* lipoproteins induce human monocytic cell expression of proinflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor kappaB. **Mediators Inflamm.**, v. 2008, p. e195427, 2008.

XIAO, L.; GLASS, J. I.; PARALANOV, V.; YOOSEPH, S.; CASSELL, G. H.; DUFFY, L. B.; WAITES, K. B. Detection and Characterization of Human *Ureaplasma* Species and Serovars by Real-Time PCR. **Journ. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 8, p. 2715-2723, 2010.

XIAO, L.; PARALANOV, V.; GLASS, J. I.; DUFFY, L. B.; ROBERTSON, J. A.; CASSELL, G. H.; CHEN, Y. Y.; WAITES, K. B. Extensive Horizontal Gene

Transfer in Ureaplasmas from Humans Questions the Utility of Serotyping for Diagnostic Purposes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 8, p. 2818-2826, 2011.

XU, Y. F.; LI, H.; CHEN, W.; YAO, X. M.; XING, Y.; WANG, X.; ZHONG, J.; MENG, G. X. *Mycoplasma hyorhinis* Activates the NLRP3 Inflammasome and Promotes Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 1-13, 2013.

YAMAZAKI, T.; MATSUMOTO, M.; MATSUO, J.; ABE, K.; MINAMI, K.; YAMAGUCHI, H. Frequency of *Chlamydia trachomatis* in Ureaplasma-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. **Bmc Infect. Dis.**, v. 12, p. 1-8, 2012.

YOU, X.; WU, Y.; ZENG, Y.; DENG, Z.; QIU, H.; YU, M. *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins induce activation of MAPKs, NF-kappaB and AP-1 in THP-1 cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 228-236, 2008.

ZUO, L. L.; WU, Y. M.; YOU, X. X. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. **J. Zhejiang. Univ. Sci. B.**, v. 10, n. 1, p. 67-76, 2009.

APÊNDICE A – Tipo de cirurgia realizada por grupo de estudo

Pacientes do Grupo Controle

Iniciais	Cirurgia
EA	Miomectomia laparoscópica
MES	Endometrioma de parede
JSF	Miomectomia laparoscópica
MCMR	Videolaparoscopia diagnóstica + Miomectomia
SCQ	Histerectomia Videolaparoscópica
SOS	Histerectomia Videolaparoscópica
GBS	Laqueadura Tubária
FGSG	Histerectomia total + Salpingectomia bilateral
AGHG	Miomectomia laparoscópica
LCT	Histerectomia total + Salpingectomia bilateral
JABS	<i>Low-pressure solvent extraction (LPSE)</i>
SB	Laqueadura Tubária
CCFO	LPSE parcial + Histerectomia total + Salpingectomia bilateral
AFOD	Laparoscopia para lise de aderências + Miomectomia anterior
ASRC	Videolaparoscopia diagnóstica
MC	Histerectomia Videolaparoscópica + Salpingectomia bilateral
AMR	Videolaparoscopia diagnóstica
EBL	Videolaparoscopia diagnóstica
GCC	Laqueadura Tubária
MODC	Videolaparoscopia diagnóstica + Histeroscopia
DCS	Videolaparoscopia diagnóstica
JPMP	Histerectomia diagnóstica + Salpingectomia direita
ICFFP	Videolaparoscopia para Histerectomia + Salpingectomia bilateral
SRA	Videolaparoscopia diagnóstica
AEMB	Videolaparoscopia Histerectomia total + Salpingectomia bilateral
LNS	Laqueadura Tubária videolaparoscópica
JMA	Laqueadura Tubária bilateral videolaparoscópica
MA	Laqueadura Tubária videolaparoscópica
RAL	Laqueadura Tubária videolaparoscópica
MFC	Videolaparoscopia diagnóstica
RGS	Laqueadura Tubária videolaparoscópica

APÊNDICE A – Tipo de cirurgia realizada por grupo de estudo

Pacientes do Grupo Caso

Iniciais	Cirurgia
MRRS	Exérese (Ex.) de Lesão de Ovário
PRMB	Ex. de nódulo retrocervical e ligamentos útero-sacros
FMM	Ex. lesões de Reto + Bexiga + Vagina
IFBC	Ex. de provável lesão de endometriose (Confirmada)
RSL	Ex. de lesão de cólon direito + apêndice
RASC	Histerectomia total + Ex. de lesão retrocervical
CRK	Ooforoplastia + Salpingectomia + Ex. lesão retrocervical
LLC	Drenagem de endometriomas bilaterais
FCF	Ooforoplastia esquerda + Ex. lesão retrocervical
RMSS	Ressecção de nódulo retrocervical + Ooforoplastia
TMA	Ressecção de foco de endometriose retrocervical
MDMV	LPSE focos de Endometriose retrocervical
SNS	Ressecção de foco de endometriose
WD	Salpingectomia bilat. + Ex. endometriose retrocervical
VAFI	Ex. de retrocervical e aderências em fundo de saco
LMB	LPSE de Endometriose retrocervical + EDT peritoneal
CLSR	Ex. de lesões retrocervical + Ooforoplastia bilateral
ARA	Ex. de Lesão parauretral
DSS	Ex. de lesões retrocervicais
MCS	Ex. lesão de fossa ovárica direita + aderências
LHTS	Histeroscopia + Ex. lesão retrocervical
CMFB	Laparoscopia para EX. de lesão superficial peritoneal
STCV	Laparoscopia para EX. de lesão retrocervical
SFD	Videolaparoscopia para histerectomia total
TMF	Ex. de lesão de vagina + Ex. de endometrioma
RNOS	Laparoscopia diagnóstica com Ex. de lesões de EDT
GKS	Videolaparoscopia para Ex. EDT
LSN	Ex. de lesão de endometriose
DNA	Ex. de endometriose retrocervical + Salpingectomia
PSO	Ex. focos de endometriose
KBCB	Videolaparoscopia para Ex. de EDT
SMRJ	Ex. de lesão retrocervical + histerectomia
RSO	Ressecção de focos peritoneais + Miomectomia VLP
AEN	Ex. lesão EDT superficial e retrocervical
EM	Ressecção de lesão de endometriose
AP	Videolaparoscopia para Ex. de lesões de Endometriose
RCMG	Histerectomia total + Ex. EDT retrocervical
JCS	Histerectomia total + Salpingectomia bilateral
AV	Ex. de endometriose de peritônio
CRN	Ex. de focos de EDT
CT	Histerectomia videolaparoscópica + apendicectomia
NGO	Ex. lesão endometriose útero-sacra
LPFB	Ex. Endometriose retrocervical e vagina
SKIM	Ex. lesão útero-sacra

APÊNDICE A – Tipo de cirurgia realizada por grupo de estudo

Pacientes do Grupo Caso

Iniciais	Cirurgia
SRC	Salpingectomia + Ooforoplastia + Miomectomia
EMNV	Videolaparoscopia diagnóstica + Salpingectomia bilat.
DRM	Histerectomia total
CPS	Ex. de lesões de endometriose
CFS	Ex. lesão de vagina e útero-sacra direita
GARH	Ex. lesões de endometriose
TVA	Ex. lesão de EDT parauretral esquerda + cistectomia
LGP	Ex. de lesões de endometriose
MCCC	Ex. de lesão retrocervical e de fossa ovárica esquerda
JMO	Lise de aderências e ressecção de EDT retrocervical
BMAB	Ex. de lesões de endometriose
ESF	Ex. de lesões de endometriose
CSA	Ex. de lesão perivesical + Ureterólise bilateral
AFA	Ressecção de lesão retrocervical + lise de aderências
ATTT	Ex. de lesão de vagina, retrocervical e paravesical
CBA	Lise de aderências + Ex. de lesão retrocervical
MMMPM	Histerectomia total + Salpingectomia bilateral
VSL	Ex. lesões de EDT em fossa ovárica
CCLS	Laparoscopia histerectomia total
BBAVO	Ex. lesão de EDT + miomectomia
ZBR	Ex. de lesões de endometriose
ALMM	Ooforectomia esq. + Ex. de EDT paravesical esquerda
JNF	Ex. lesões de vagina e fossa ovárica esquerda
TCN	Ex. de lesões de endometriose
MFC	Miomectomia + Ex. lesão retrocervical
DPR	Histerectomia total + Salpingectomia
GTBV	Histerectomia total + Salpingectomia
ECGE	Ex. lesão de EDT
LFT	Laqueadura tubárea + Ex. lesão superficial de EDT

APÊNDICE B – Ficha de atendimento ginecológico ambulatorial

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS MESTRADO EM MICROBIOLOGIA FICHA DE ATENDIMENTO GINECOLÓGICO		
NÚMERO:		DATA:
UNIDADE DE SAÚDE:		
NOME (Apenas Iniciais):		IDADE (Anos):
REGIÃO: ☐ RURA ☐ 2. URBANA		ESCOLARIDADE
ANO DO ÚLTIMO EXAME		
RAÇA/COR: ☐ BRANCA ☐ 2. ☐ PARDADA ☐ 3. ☐ AMARELA ☐ 4. PARDA ☐ 5. INDÍGENA		
MOTIVO DA CONSULTA:		
HISTÓRIA MENSTRUAL		
MENARCA		ANOS
		DATA DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO
HISTÓRIA SEXUAL		
IDADE DO 1º INTERCURSO SEXUAL	VIDA SEXUAL ATUAL 1. ☐ ATIVA ☐ 2. INATIVA	RELAÇÃO ESTÁVEL 1. ☐ SIM ☐ NÃO
LIBIDO 1. ☐ MANTIDA ☐ 2. PRESUMIDA ☐ 3. DIMINuíDA ☐ 4. AUMENTADA	ORGASMO 1. ☐ FREQUENTE ☐ 2. ☐ 3. NUNCA	
NÚMERO DE PARCEIROS NA VIDA 1. ☐ UM ☐ 2. A 5 ☐ 3. 6 A 10 ☐ 4. 10 OU MAIS	NÚMERO DE PARCEIROS (ÚLT. 3 MESES) 1. ☐ UM ☐ DOIS ☐ TRÊS ☐ 4. QUATRO OU MAIS	
DISPAREUNIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO	SINUSIORRAGIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO	PRESERVATIVO 1. ☐ SIM SEMPRE ☐ 2. ÀS VÉZES ☐ 3. RARAMENTE ☐ 4. NUNCA
MÉTODO ANTICONCEPCIONAL	TEMPO DE USO DE ANTICONCEPCIONAL	COMO USA? (SOLICITAR DESCRIÇÃO DO USO) 1. ☐ CORRETAMENTE ☐ 2. INCORRETAMENTE
HISTÓRICO OBSTÉTRICO		
NÚMERO DE GESTAÇÕES	ABORTAMENTOS	
	ESPONTÂNEOS	PROVOCADOS
	PARTOS	
	PREMATUROS	A TERMO NATURAIS
		A TERMO ARTIFICIAIS
ANTECEDENTES PATOLÓGICOS		
DST 1. ☐ PRÉVIA E TRATADA ☐ 2. DESCONHECE OU NEGA ☐ 3. PRÉVIA E NÃO TRATADA ☐		HIV 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ 3. NÃO SABE
SINTOMATOLOGIA		
1. CORRIMENTO 1. ☐ SIM ☐ NÃO	2. DISÚRIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO	3. ODOR 1. ☐ FÉTIDO ☐ CARACTERÍSTICO
4. DOR PÉLVICA 1. ☐ SIM ☐ NÃO	5. PRURIDO 1. ☐ SIM ☐ NÃO	6. HIPEREMIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO
7. VERRUGA	8. BOLHA/VESÍCULA	9. FERIDA/ÚLCERA

1. ☐ SIM ☐ NÃO	1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE	1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE
10. PETÉQUIAS 1. ☐ SIM ☐ NÃO	OUTRO	
1. PARCEIRO/SINTOMATOLOGIA		1.1 QUEIXA ☐ SIM ☐ 2. NÃO
1.2 HIPEREMIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE	1.3 CORRIMENTO ANORMAL 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE	1.4 VERRUGA 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE
1.5 BOLHA 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE	1.6 DISÚRIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE	1.7 PRURIDO 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE
1.8 DISPAREUNIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NÃO SABE	OUTRO	
TRATAMENTO		
PARA MENOPAUSA 1. ☐ SIM ☐ NÃO		ESTROGENIZADA PARA PAPANICOLAU 1. ☐ SIM ☐ NÃO

HISTÓRIA DE TRATAMENTO ANTERIOR			
COMPRIMIDO 1. ☐ SIM ☐ NÃO	CREME VAGINAL 1. ☐ SIM ☐ NÃO	TEMPO 1. ☐ 1 SEMANA ☐ 2 SEMAN ☐ 3. MAIS DE 2 SEMANAS	
INJEÇÃO 1. ☐ SIM ☐ NÃO	PARCEIRO TRATADO 1. ☐ SIM ☐ NÃO	RELAÇÃO SEXUAL NO TRATAMENTO 1. ☐ SIM COM CONDO ☐ 2. SIM SEM ☐ NDON 3. NÃO	
2. PARCEIRO/TRATAMENTO		2.1 SABE INFORMAR ☐ 1. ☐ 2. NÃO	
2.2 PARCEIRO TRATADO 1. ☐ SIM ☐ NÃO	2.3 TIPO DO TRATAMENTO 1. ☐ COM ☐ 2. P ☐ DA 3. INJEÇÃO		2.4 TRATAMENTO CONCOMITANTE C/ PARCERIA 1. ☐ SIM ☐ NÃO
EXAME GINECOLÓGICO			
ACHADOS EM GENITÁLIA EXTERNA 1. ☐ VESÍCULA 2. ☐ VERRUGA 3. ☐ ÚLCERA 4. ☐ BOLHA 5. ☐ PETÉQUIAS 6. ☐ ODOR 7. OUTRO (Descrever)			
ACHADOS EM GENITÁLIA INTERNA 1. ☐ MUCOPUS ENDOCERVICAL 2. ☐ CORRIMENTO VAGINAL 3. ☐ COLO FRIÁVEL 4. ☐ MASSA ANORMAL DE TECIDO NO COLO 5. OUTROS (Descrever):			
CONDUTA			
____/____/____ DATA E CARIMBO		_____ ASSINATURA	

APÊNDICE C – Perfil de prevalência dos *Mollicutes* nas amostras *swab* endocervical de acordo com o uso de hormônio

Método Contraceptivo	Distribuição (%) entre casos e controles para amostras de <i>swab</i> endocervical																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR		qPCR		p*	qPCR		qPCR		p*	qPCR		qPCR		p*	qPCR		qPCR		p*
	Positivo	Negativo	OR	IC 95%		Positivo	Negativo	OR	IC 95%		Positivo	Negativo	OR	IC 95%		Positivo	Negativo	OR	IC 95%	
	n (%)	n (%)				n (%)	n (%)				n (%)	n (%)				n (%)	n (%)			
Nenhum	7 (58,3)	47 (59,5)	1,00		0,605	22 (57,9)	32 (60,4)	1,00		0,911	6 (85,7)	48 (57,1)	1,00		0,438	8 (53,3)	46 (60,5)	1,00		0,783
ACO/Injetável	4 (33,3)	30 (38,0)	3,35	[0,26; 42,07]		15 (39,5)	19 (35,8)	0,87	[0,36; 2,07]		1 (14,3)	33 (39,3)	4,12	[0,47; 35,87]		7 (46,7)	27 (35,5)	0,67	[0,21; 2,05]	
SIU-LNG	1 (8,3)	2 (2,5)	3,75	[0,27; 51,37]		1 (2,6)	2 (3,8)	1,37	[0,11;16,11]		0 (0)	3 (3,6)	ND	-		0 (0)	3 (3,9)	ND	-	

Nota: Perda de observação: 13; n= 91. *Teste de verossimilhança.
 Legenda: SIU-LNG: Sistema Intrauterino Liberador de Levonorgestrel; ND: Não definida

APÊNDICE D – Perfil de prevalência dos *Mollicutes* nas amostras de fluido peritoneal de acordo com o uso de hormônio

Método Contraceptivo	Distribuição (%) entre casos e controles para amostras de fluido peritoneal																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
	n (%)	n (%)				n (%)	n (%)				n (%)	n (%)				n (%)	n (%)			
Nenhum	17 (70,8)	28 (58,3)	1,00		0,775	12 (75,0)	33 (58,9)	1,00		0,649	1 (50,0)	44 (62,9)	1,00		0,903	0 (0)	45 (62,5)	ND		-
ACO/Injetável	7 (29,2)	17 (35,4)	1,47	[0,50; 4,28]		4 (25,0)	20 (35,7)	1,81	[0,51; 6,41]		1 (50,0)	23 (32,9)	0,52	[0,03; 8,74]		0 (0)	24 (33,3)	ND		-
SIU-LNG	0 (0)	3 (6,2)	ND	-		0 (0)	3 (5,4)	ND	-		0 (0)	3 (4,3)	ND	-		0 (0)	3 (4,2)	ND		-

Nota: Perda de observação: 32; n = 72. *Teste de verossimilhança.
Legenda: SIU-LNG: Sistema Intrauterino Liberador de Levonorgestrel; ND: Não definida

APÊNDICE E – Perfil de prevalência dos *Mollicutes* nas amostras de tecido de biópsia de acordo com o uso de hormônio

Método Contraceptivo	Distribuição (%) entre casos e controles para amostras de tecido de biópsia																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
	n (%)	n (%)				n (%)	n (%)				n (%)	n (%)				n (%)	n (%)			
Nenhum	5 (50,0)	50 (61,7)	1,00		0,692	2 (50,0)	53 (60,9)	1,00		0,872	0 (0)	55 (60,4)	ND		-	0 (0)	55 (60,4)	ND		-
ACO/Injetável	5 (50,0)	28 (34,6)	0,56	[0,14; 2,10]		2 (50,0)	31 (35,6)	0,58	[0,78; 4,36]		0 (0)	33 (36,3)	ND	-		0 (0)	33 (36,3)	ND	-	
SIU-LNG	0 (0)	3 (3,7)	ND	-		0 (0)	3 (3,4)	ND			0 (0)	3 (3,3)	ND	-		0 (0)	3 (3,3)	ND	-	

Nota: Perda de observação: 13; n = 91. *Teste de verossimilhança.
 Legenda: SIU-LNG: Sistema Intrauterino Liberador de Levonorgestrel; ND: Não definida

APÊNDICE F – Perfil de prevalência de HPV por amostra clínica e *N. gonorrhoeae* nas amostras de swab de acordo com o uso de hormônio.

Método Contraceptivo n (%)	Distribuição (%) entre casos e controles - Amostra por Microrganismo																			
	HPV															<i>N. gonorrhoeae</i>				
	Swab endocervical					Fluido peritoneal					Biópsia de tecido					Swab endocervical				
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Nenhum	1 (20,0)	51 (61,4)	1,00		0,232	3 (60,0)	40 (61,5)	1,00		0,980	3 (100)	52 (59,8)	1,00		-	2 (100)	55 (59,8)	1,00		-
ACO/Injetável	4 (80,0)	29 (34,9)	0,14	[0,01; 1,33]		2 (40,0)	22 (33,8)	0,82	[0,12; 5,31]		0 (0)	32 (36,8)	ND	-		0 (0)	34 (37,0)	ND	-	
SIU-LNG	0 (0)	3 (3,6)	ND	-		0 (0)	3 (4,6)	ND	-		0 (0)	3 (3,4)	ND	-		0 (0)	3 (3,3)	ND	-	

Nota: Perda de observação (HPV - Swab): 16; n = 88; Perda de observação (HPV – Fluido Peritoneal): 34; n = 70; Perda de observação (HPV – Tecido de Biópsia): 14; n = 90.

Nota: Perda de observação (*N. gonorrhoeae*): 10; n = 94.

*Teste de verossimilhança

Legenda: SIU-LNG: Sistema Intrauterino Liberador de Levonorgestrel; ND: Não definida

APÊNDICE G – Prevalência de coinfecção de *Mollicutes* (*M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*), HPV e *N. gonorrhoeae* em amostras de swab endocervical de mulheres com e sem endometriose, São Paulo - SP, 2014.2 – 2015.1.

Microrganismos	Caso (EDT) (n = 73) n (%)	Controle (n = 31) n (%)	Total (n = 104) n (%)
MG +MH	6 (8,2)	2 (6,4)	8 (7,7)
MG + UU	1 (1,4)	0 (0)	1 (1,0)
MH + UU	1 (1,4)	0 (0)	1 (1,0)
MH + UP	4 (5,5)	1 (3,2)	5 (4,8)
UU + UP	1 (1,4)	0 (0)	1 (1,0)
MG + MH + UP	1 (1,4)	0 (0)	1 (1,0)
MG + MH + UP + UU	1 (1,4)	0 (0)	1 (1,0)
MG + MH + UU + HPV	1 (1,4)	0 (0)	1 (1,0)
Total de mulheres com coinfecção	16 (21,9)	3 (9,7)	19 (18,3)

Legenda: MG = *Mycoplasma genitalium*, MH = *Mycoplasma hominis*, UU = *Ureaplasma urealyticum*, UP = *Ureaplasma parvum*, HPV = Papilomavírus humano. n = 104 (número absoluto de amostras testadas).

Nota: em negrito, estão em destaque as coinfecções mais frequentes

APÊNDICE H – Prevalência de coinfecção de micoplasmas genitais (*M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*) em amostras de fluido peritoneal de mulheres com e sem endometriose, São Paulo - SP, 2014.2 – 2015.1.

Microrganismos	Caso (EDT) (n = 54) n (%)	Controle (n = 24) n (%)	Total (n = 78) n (%)
MG +MH	6 (11,1)	1 (4,2)	7 (9,0)
MG + HPV	3 (5,6)	0 (0)	3 (3,8)
MH + HPV	1 (1,9)	0 (0)	1 (1,3)
MG + MH + UU	1 (1,9)	0 (0)	1 (1,3)
MG + MH + HPV	1 (1,9)	0 (0)	1 (1,3)
Total de mulheres com coinfecção	11 (20,4)	1 (4,2)	12 (15,4)

Legenda: MG = *Mycoplasma genitalium*, MH = *Mycoplasma hominis*, UU = *Ureaplasma urealyticum*, UP = *Ureaplasma parvum*, HPV = Papilomavírus humano. n = 78 (número absoluto de amostras testadas).

Nota: em negrito, estão em destaque as coinfecções mais frequentes.

APÊNDICE I – Prevalência de coinfecção de micoplasmas genitais (*M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*) em amostras de tecido de biópsia de mulheres com e sem endometriose, São Paulo - SP, 2014.2 – 2015.1.

Microrganismos	Caso (EDT) (n = 68) n (%)	Controle (n = 30) n (%)	Total (n = 98) n (%)
MG + MH	0	1 (3,3)	1 (1,0)
MG + HPV	1 (1,5)	0	1 (1,0)
Total de mulheres com coinfecção	1	1	2 (2,0)

Legenda: MG = *Mycoplasma genitalium*, MH = *Mycoplasma hominis*, UU = *Ureaplasma urealyticum*, UP = *Ureaplasma parvum*, HPV = Papilomavírus humano. n = 98 (número absoluto de amostras testadas).

APÊNDICE J – Detecção de *Mollicutes* em amostras de fluido peritoneal por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Sintomas	Distribuição (%) entre qPCR-positivo e negativo por microrganismo para amostras de Fluido Peritoneal																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR	qPCR				qPCR	qPCR				qPCR	qPCR				qPCR	qPCR			
	Positivo	Negativo	OR	IC 95%	p*	Positivo	Negativo	OR	IC 95%	p*	Positivo	Negativo	OR	IC 95%	p*	Positivo	Negativo	OR	IC 95%	p*
Dismenorreia (EAD), n (%) ¹																				
≥ 7	17 (70,8)	31 (64,6)	1,33	[0,46; 3,84]	0,596	10 (62,5)	38 (67,9)	0,78	[0,24; 2,51]	0,688	1 (50,0)	47 (67,1)	0,48	[0,02; 8,18]	1,000	0 (0)	48 (66,7)	ND	-	-
< 7	7 (29,2)	17 (35,4)				6 (37,5)	18 (32,1)				1 (50,0)	23 (32,9)				0 (0)	24 (33,3)			
Dor pélvica cíclica (EAD), n (%) ²																				
≥ 7	9 (37,5)	18 (37,5)	1,00	[0,36; 2,75]	1,000	7 (43,8)	20 (35,7)	1,40	[0,45; 4,32]	0,558	0 (0)	27 (38,6)	1,04	[0,98; 1,11]	0,525 [§]	0 (0)	27 (37,5)	ND	-	-
< 7	15 (62,5)	30, 62,5)				9 (56,2)	36 (64,3)				2 (100)	43 (61,4)				0 (0)	45 (62,5)			
Dispareunia (EAD), n (%) ³																				
≥ 7	9 (39,1)	23 (47,9)	0,69	[0,25; 1,92]	0,486	5 (31,2)	27 (49,1)	0,47	[0,14; 1,53]	0,207	1 (50,0)	31 (44,9)	1,22	[0,07; 20,40]	1,000	0 (0)	32 (45,1)	ND	-	-
< 7	14 (60,9)	25 (52,1)				11 (68,8)	28 (50,9)				1 (50,0)	38 (55,1)				0 (0)	39 (54,9)			
Alt. intest. cíclicas (EAD), n (%) ⁴																				
≥ 7	5 (20,8)	12 (25,0)	0,78	[0,24; 2,57]	0,695	3 (18,8)	14 (25,0)	0,69	[0,17; 2,78]	0,604	0 (0)	17 (24,3)	1,03	[0,98; 1,09]	1,000 [§]	0 (0)	17 (23,6)	ND	-	-
< 7	19 (79,2)	36 (75,0)				13 (81,2)	42 (75,0)				2 (100)	53 (75,7)				0 (0)	55 (76,4)			
Alt. urin. cíclicas (EAD), n (%) ⁵																				
≥ 7	6 (25,0)	5 (10,4)	2,86	[0,77; 10,60]	0,203	0 (0)	11 (19,6)	1,35	[1,26; 1,57]	0,108 [§]	0 (0)	11 (15,7)	1,03	[0,98; 1,08]	1,000	0 (0)	11 (15,3)	ND	-	-
< 7	18 (75,0)	4 (89,6)				16 (100)	45 (80,4)				2 (100)	59 (84,3)				0 (0)	61 (84,7)			
Infertilidade, n (%) ⁶																				
Sim	8 (34,8)	19 (39,6)	0,81	[0,28; 2,29]	0,697	6 (37,5)	21 (38,2)	0,97	[0,30; 3,06]	0,961	0 (0)	27 (39,1)	1,04	[0,98; 1,11]	0,522 [§]	0 (0)	27 (38,0)	ND	-	-
Não	15 (65,2)	29 (60,4)				10 (62,5)	34 (61,8)				2 (100)	42 (60,9)				0 (0)	44 (62,0)			

Nota: Perda de observação: ¹Dismenorrea: perda de 32 (n = 72); ²Dor pélvica cíclica: perda de 32 (n = 72); ³Dispareunia: perda de 33 (n = 71); ⁴Alterações intestinais cíclicas: perda de 32 (n = 72); ⁵Alterações urinárias cíclicas: perda de 32 (n = 72); ⁶Infertilidade: perda de 33 (n = 71)

*Significância estatística quando p < 0,05

*Teste de Qui-quadrado

φ Teste de Fisher

ND: Não definida

APÊNDICE K – Detecção de *Mollicutes* em amostras de tecido de biópsia por PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Sintomas	Distribuição (%) entre qPCR-positivo e negativo por microrganismo para amostras de Tecido de Biópsia																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*	qPCR Positivo	qPCR Negativo	OR	IC 95%	p*
Dismenorreia (EAD), n (%)																				
≥ 7	9 (90,0)	52 (65,8)	4,67	[0,56; 38,84]	0,234	2 (66,7)	59 (68,6)	0,91	[0,08; 10,53]	1,000 [‡]	0 (0)	61 (68,5)	ND	-	-	0 (0)	61 (68,5)	ND	-	-
< 7	1 (10,0)	27 (34,2)				1 (33,3)	27 (31,4)				0 (0)	28 (31,5)				0 (0)	28 (31,5)			
Dor pélvica cíclica (EAD), n (%)																				
≥ 7	5 (50,0)	29 (36,7)	1,72	[0,46; 6,46]	0,415	0 (0)	34 (39,5)	1,05	[0,99; 1,12]	0,284 [‡]	0 (0)	34 (38,2)	ND	-	-	0 (0)	34 (38,2)	ND	-	-
< 7	5 (50,0)	50 (63,3)				3 (100)	52 (60,5)				0 (0)	55 (61,8)				0 (0)	55 (61,8)			
Dispareunia (EAD), n (%)																				
≥ 7	3 (30,0)	33 (42,3)	0,58	[0,14; 2,43]	0,686	1 (33,3)	35 (41,2)	0,71	[0,06; 8,18]	1,000 [‡]	0 (0)	36 (40,9)	ND	-	-	0 (0)	36 (40,9)	ND	-	-
< 7	7 (70,0)	45 (57,7)				2 (66,7)	50 (58,8)				0 (0)	52 (59,1)				0 (0)	52 (59,1)			
Alt. intest. cíclicas (EAD), n (%)																				
≥ 7	2 (18,2)	18 (22,8)	0,75	[0,14; 3,80]	1,000	2 (50)	18 (20,9)	3,77	[0,49; 28,69]	0,213 [‡]	0 (0)	20 (22,2)	ND	-	-	0 (0)	20 (22,2)	ND	-	-
< 7	9 (81,8)	61 (77,2)				2 (50)	68 (79,1)				0 (0)	70 (77,8)				0 (0)	70 (77,8)			
Alt. urin. Cíclicas (EAD), n (%)																				
≥ 7	1 (9,1)	11 (13,9)	0,61	[0,07; 5,31]	1,000	0 (0)	12 (14,0)	1,05	[1,00; 1,11]	1,000 [‡]	0 (0)	12 (13,3)	ND	-	-	0 (0)	12 (13,3)	ND	-	-
< 7	10 (90,9)	68 (86,1)				4 (100)	74 (86,0)				0 (0)	78 (86,7)				0 (0)	78 (86,7)			
Infertilidade, n (%)																				
Sim	6 (60,0)	29 (37,2)	2,53	[0,66; 9,73]	0,165	3 (75,0)	32 (38,1)	4,87	[0,48; 48,89]	0,297 [‡]	0 (0)	35 (39,8)	ND	-	-	0 (0)	35 (39,8)	ND	-	-
Não	4 (40,0)	49 (62,8)				1 (25,0)	52 (61,9)				0 (0)	53 (60,2)				0 (0)	53 (60,2)			

Nota: Perda de observação: ¹Dismenorreia: perda de 15 (n = 89); ²Dos pélvica cíclica: perda de 15 (n = 89); ³Dispareunia: perda de 16 (n = 88); ⁴Alterações intestinais cíclicas: perda de 14 (n = 90); ⁵Alterações urinárias cíclicas: perda de 14 (n = 90); ⁶Infertilidade: perda de 16 (n = 88)

*Significância estatística quando p < 0,05

*Teste de Qui-quadrado

‡ Teste de Fisher

ND: Não definida

APÊNDICE L – Detecção de HPV e *N. gonorrhoeae* em amostras clínicas por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Variáveis	Distribuição (%) entre casos e controles - Amostra por Microrganismo																			
	HPV										<i>N. gonorrhoeae</i>									
	Swab endocervical					Fluido peritoneal					Biópsia de tecido					Swab endocervical				
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
Dismenorreia, n (%)																				
≥ 7	5 (100)	55 (67,9)	0,98	[0,84; 0,98]	0,317 [‡]	4 (100)	43 (66,2)	0,91	[0,83; 0,99]	0,299 [‡]	1 (50,0)	59 (68,6)	0,45	[0,02; 7,59]	0,538 [‡]	1 (50,0)	62 (68,9)	0,45	[0,02; 7,48]	0,533 [‡]
< 7	0 (0)	26 (32,1)				0 (0)	22 (33,8)				1 (50,0)	27 (31,4)				1 (50,0)	28 (31,1)			
Dor pélvica cíclica, n (%)																				
≥ 7	4 (80,0)	31 (38,3)	6,45	[0,68; 60,39]	0,153 [‡]	3 (75,0)	23 (35,4)	5,47	[0,53; 55,72]	0,147 [‡]	0 (0)	33 (38,4)	1,03	[0,98; 1,09]	0,526 [‡]	1 (50,0)	35 (38,9)	1,57	[0,09; 25,94]	1,000 [‡]
< 7	1 (20,0)	50 (61,7)				1 (25,0)	42 (64,6)				2 (100)	53 (61,6)				1 (50,0)	55 (61,1)			
Dispareunia, n (%)																				
≥ 7	3 (75,0)	29 (35,8)	5,37	[0,53; 54,10]	0,148 [‡]	2 (66,7)	29 (44,6)	2,48	[0,21; 28,76]	0,588 [‡]	0 (0)	35 (41,2)	1,04	[0,98; 1,09]	0,513 [‡]	1 (50,0)	36 (40,4)	1,47	[0,08; 24,30]	1,000 [‡]
< 7	1 (25,0)	52 (64,2)				1 (33,3)	36 (55,4)				2 (100)	50 (58,8)				1 (50,0)	52 (59,6)			
Alt. Intest. cíclicas, n (%)																				
≥ 7	2 (40,0)	17 (20,7)	2,54	[0,39; 16,49]	0,299 [‡]	2 (50,0)	15 (23,1)	3,33	[0,43; 25,71]	0,252 [‡]	0 (0)	20 (23,0)	1,03	[0,98; 1,07]	1,000 [‡]	1 (50,0)	19 (20,9)	3,78	[0,22; 63,41]	0,386 [‡]
< 7	3 (60,0)	65 (79,3)				2 (50,0)	50 (76,9)				2 (100)	67 (77,0)				1 (50,0)	72 (79,1)			
Alt. Urin. cíclicas, n (%)																				
≥ 7	2 (40,0)	9 (11,0)	5,40	[0,79; 36,82]	0,118 [‡]	1 (25,0)	10 (15,4)	1,83	[0,17; 19,44]	0,509 [‡]	0 (0)	12 (13,8)	1,02	[0,99; 1,06]	1,000 [‡]	0 (0)	12 (13,2)	1,02	[0,99; 1,06]	1,000 [‡]
< 7	3 (60,0)	73 (89,0)				3 (75,0)	55 (84,6)				2 (100)	75 (86,2)				2 (100)	79 (86,8)			
Infertilidade, n (%)																				
Sim	1 (20,0)	34 (43,0)	0,33	[0,03; 3,09]	0,396 [‡]	1 (25,0)	25 (39,1)	0,52	[0,05; 5,28]	1,000 [‡]	0 (0)	34 (40,0)	1,03	[0,98; 1,09]	0,518 [‡]	0 (0)	36 (40,4)	1,03	[0,98; 1,09]	0,515 [‡]
Não	4 (80,0)	45 (57,0)				3 (75,0)	39 (60,9)				2 (100)	51 (60,0)				2 (100)	52 (59,6)			

APÊNDICE L – Detecção de HPV e *N. gonorrhoeae* em amostras clínicas por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o perfil clínico de mulheres com endometriose (caso) e sem endometriose (controle), São Paulo – SP, 2014.2 – 2015.1.

Nota 1: Amostras de Swab HPV – Perda de observação: ¹Dismenorreia: perda de 18 (n = 86); ²Dos pélvica cíclica: perda de 18 (n = 86); ³Dispareunia: perda de 19 (n = 85); ⁴Alterações intestinais cíclicas: perda de 17 (n = 87); ⁵Alterações urinárias cíclicas: perda de 17 (n = 87); ⁶Infertilidade: perda de 20 (n = 84).

Nota 2: Amostras de Swab *N. gonorrhoeae* – Perda de observação: ¹Dismenorreia: perda de 12 (n = 92); ²Dos pélvica cíclica: perda de 12 (n = 92); ³Dispareunia: perda de 13 (n = 91); ⁴Alterações intestinais cíclicas: perda de 11 (n = 93); ⁵Alterações urinárias cíclicas: perda de 11 (n = 93); ⁶Infertilidade: perda de 14 (n = 90).

Nota 3: Amostras de Fluido Peritoneal – Perda de observação: ¹Dismenorreia: perda de 35 (n = 69); ²Dos pélvica cíclica: perda de 35 (n = 69); ³Dispareunia: perda de 36 (n = 68); ⁴Alterações intestinais cíclicas: perda de 35 (n = 69); ⁵Alterações urinárias cíclicas: perda de 35 (n = 69); ⁶Infertilidade: perda de 36 (n = 68).

Nota 4: Amostras de Tecido de Biópsia – Perda de observação: ¹Dismenorreia: perda de 16 (n = 88); ²Dos pélvica cíclica: perda de 16 (n = 88); ³Dispareunia: perda de 17 (n = 87); ⁴Alterações intestinais cíclicas: perda de 15 (n = 89); ⁵Alterações urinárias cíclicas: perda de 15 (n = 89); ⁶Infertilidade: perda de 17 (n = 87);

*Significância estatística quando $p < 0,05$

*Teste de Chi-quadrado

ϕ Teste de Fisher

APÊNDICE M – Detecção de *Mollicutes* em amostras de *swab* endocervical por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.

Variáveis	Distribuição (%) entre qPCR-positivo e negativo por microrganismo para amostras de swab endocervical																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
ASRM estágio, n (%)¹																				
I e II	7 (70,0)	30 (49,2)	2,41	[0,57; 10,20]	0,222 [†]	17 (54,8)	20 (50,0)	1,21	[0,474; 3,11]	0,686	4 (66,7)	33 (50,8)	1,93	[0,33; 11,33]	0,456 [†]	6 (60,0)	31 (50,8)	1,45	[0,37; 5,66]	0,590 [†]
III e IV	3 (30)	31 (50,8)				14 (45,2)	20 (50,0)				2 (33,3)	32 (49,2)				4 (40,0)	30 (49,2)			
Tipo de Endom, n (%)²																				
Sem Endometriose	3 (23,1)	24 (28,6)	1,00		0,884 [¥]	11 (26,8)	16 (28,6)	1,00		0,977 [¥]	1 (14,3)	26 (28,9)	1,00		0,305 [¥]	6 (37,5)	21 (25,9)	1,00		0,851 [¥]
Peritoneal	3 (23,1)	12 (14,3)	ND	--		7 (17,1)	8 (14,3)	0,78	[0,22; 2,80]		3 (42,9)	12 (13,3)	0,15	[0,01; 1,63]		2 (12,5)	13 (16,0)	1,86	[0,33; 10,61]	
Ovariana	0 (0)	2 (2,4)	1,64	[0,36; 7,32]		1 (2,4)	1 (1,8)	0,68	[0,03; 12,20]		0 (0)	2 (2,2)	ND	--		0 (0)	2 (2,5)	ND	--	
Profunda	7 (53,8)	46 (54,8)	2,00	[0,35; 11,43]		22 (53,7)	31 (55,4)	0,96	[0,37; 2,48]		3 (42,9)	50 (55,6)	0,64	[0,06; 6,47]		8 (50,0)	45 (55,6)	1,60	[0,49; 5,22]	

Nota: Perda de observação: ¹ASRM estágio: perda de 27 (n = 71); ²Tipo de EDT: perda de 3 (n = 97)

*Significância estatística quando p < 0,05

[†] Teste de Qui-quadrado

[¥] Razão de Verossimilhança

ND: Não definida

APÊNDICE N – Detecção de *Mollicutes* em amostras de fluido peritoneal por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.

Variáveis	Distribuição (%) entre qPCR-positivo e negativo por microrganismo para amostras de Fluido Peritoneal																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
ASRM estágio, n (%)¹																				
I e II	13 (59,1)	15 (46,9)	1,63	[0,56; 4,90]	0,377†	11 (73,3)	17 (43,6)	3,55	[0,96; 13,16]	0,050	2 (100)	26 (50,0)	ND	-	-	0 (0)	28 (51,9)	ND	-	-
III e IV	9 (40,9)	17 (53,1)				4 (26,7)	22 (56,4)				0 (0)	26 (50,0)				0 (0)	26 (48,1)			
Tipo de Endom, n (%)																				
Sem Endometriose	5 (18,5)	19 (37,3)	1,00		0,325*	4 (21,1)	20 (33,9)	1,00		0,189*	0 (0)	24 (31,6)	ND	-	-	0 (0)	24 (30,8)	ND	-	-
Peritoneal	5 (18,5)	5 (9,8)	0,26	[0,05; 1,28]		5 (26,3)	5 (8,5)	0,20	[0,03; 1,03]		1 (50,0)	9 (11,8)				0 (0)	10 (12,8)			
Ovariana	0 (0)	2 (3,9)	ND	--		1 (5,3)	1 (1,7)	0,20	[0,01; 3,90]		0 (0)	2 (2,6)				0 (0)	2 (2,6)			
Profunda	17 (63,0)	25 (49,0)	0,38	[0,12; 1,23]		9 (47,4)	33 (55,9)	0,73	[1,99; 2,69]		1 (50,0)	41 (53,9)				0 (0)	42 (53,8)			

Nota: Perda de observação: [†]ASRM estágio: perda de 24 (n = 54)

*Significância estatística quando p < 0,05

[†] Teste de Qui-quadrado

[‡] Razão de Verossimilhança

ND: Não definida

APÊNDICE O – Detecção de *Mollicutes* em amostras de tecido de biópsia por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sua relação com o estadiamento e tipo de endometriose.

Variáveis	Distribuição (%) entre qPCR-positivo e negativo por microrganismo para amostras de tecido de biópsia																			
	<i>M. genitalium</i>					<i>M. hominis</i>					<i>U. urealyticum</i>					<i>U. parvum</i>				
	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*	qPCR	qPCR	OR	IC 95%	p*
	Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo				Positivo	Negativo			
ASRM estágio, n (%)¹																				
I e II	2 (18,2)	28 (32,2)	0,46	[0,09; 2,31]	0,342 [†]	0 (0)	30 (31,9)	1,06	[1,00; 1,12]	0,309 [‡]	0 (0)	30 (30,6)	ND	-	-	0 (0)	30 (30,6)	ND	-	-
III e IV	9 (81,8)	59 (67,8)				4 (100)	64 (68,1)				0 (0)	68 (69,4)				0 (0)	68 (69,4)			
Tipo de Endom, n (%)²																				
Sem Endometriose	2 (18,2)	28 (32,2)	1,00		0,244 [*]	0 (0)	30 (31,9)	1,00	-	-	0 (0)	30 (30,6)	1,00	-	-	0 (0)	30 (30,6)	1,00	-	-
Peritoneal	3 (27,3)	11 (12,6)	0,26	[0,03; 1,78]		1 (25,0)	13 (13,8)	ND	-		0 (0)	14 (14,3)	ND	-		0 (0)	14 (14,3)	ND	-	
Ovariana	1 (9,1)	1 (1,1)	0,07	[0,003; 1,61]		0 (0)	2 (2,1)	ND	-		0 (0)	2 (2,0)	ND	-		0 (0)	2 (2,0)	ND	-	
Profunda	5 (45,5)	47 (54,0)	0,67	[0,12; 3,69]		3 (75,0)	49 (52,1)	ND	-		0 (0)	52 (53,1)	ND	-		0 (0)	52 (53,1)	ND	-	

Nota: Perda de observação: ¹ASRM estágio: perda de 06 (n = 98)

*Significância estatística quando p < 0,05

[†] Teste de Qui-quadrado

[‡] Razão de Verossimilhança

[§] Teste de Fisher

ND: Não definida

ANEXO A – Parecer 1170/CEPSH **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de março de 2014.

PARECER 1170/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação da participação dos Mollicutes e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana* " do pesquisador JORGE TIMENETSKY e aluno GUILHERME BARRETO CAMPOS.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.02.2015**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

ANEXO B – Parecer AVAP GBC260

**INSTITUTO SÍRIO-LIBANÊS
DE ENSINO E PESQUISA**

**DIRETORIA DE PESQUISA
HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS**

Registro AVAP: **GBC260**

Pesquisador Principal: **Mauricio Simões Abraão**

Ref: **“Avaliação da participação dos Mollicutes e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana”.**

Prezada pesquisadora,

A Diretoria de Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio-Libanês analisou e **APROVOU** os documentos citados abaixo, bem como as declarações referentes ao protocolo de pesquisa supracitado em 30 de maio de 2014;

- Protocolo de pesquisa;
- Orçamento detalhado do projeto;
- Equipe envolvida.

São Paulo, 03 de junho de 2014.

Central de Apoio ao Pesquisador
Hospital Sírio-Libanês

ANEXO C – Parecer nº 550.484

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da participação dos Mollicutes e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana

Pesquisador: Jorge Timenetsky

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);
Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas);
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 23710513.7.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Envio de Relatório Parcial conforme prazo estipulado pelo Comitê de Ética do

Data do Envio: 03/03/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.223.722

Apresentação da Notificação:

Consultar parecer anterior.

Objetivo da Notificação:

Consultar parecer anterior.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO**

Continuação do Parecer: 1.223.722

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Consultar parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Até o momento foram incluídos 99 pacientes, e devidamente aplicado o termo de consentimento conforme as resoluções vigentes. A aderência dos pacientes ao protocolo de pesquisa foi de 100%, e não houve dificuldade para realização dos procedimentos do estudo.

O estudo foi conduzido sob responsabilidade de um médico, em conformidade com o protocolo clínico proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Consultar parecer anterior.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou favorável à aprovação do relatório parcial

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o relatório parcial.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatório Parcial Comitê de Ética Doutorado.docx	03/03/2015 18:18:57		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Setembro de 2015

Assinado por:

Paolo Marinho de Andrade Zanotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Avaliação da participação dos Mollicutes e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, profissão _____, residente e domiciliado na _____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo **“Avaliação da participação dos Mollicutes e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana”**. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada endometriose a ser estudada no projeto **“Avaliação da participação dos Mollicutes e outros microrganismos de interesse genital na endometriose humana”**;
- II) Serão coletadas amostras de líquido intraperitoneal (fluido na cavidade formada entre as camadas de peritônio que revestem as alças intestinais) biópsia de lesão do peritônio pélvico (procedimento cirúrgico no qual se colhe uma amostra de tecidos ou células para posterior estudo em laboratório).
- III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

- VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.
☐ Sim ou ☐ Não
- IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no Fone 3091.7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou (11 3091-7297 *joti@usp.br*) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, de de 20____

☐ Paciente / ☐ Responsável

Testemunha 1: _____

Nome / RG / Telefone:

Testemunha 2: _____

Nome / RG / Telefone:

Responsável pelo Projeto: _____

PROF. DR. JORGE TIMENETSKY

ANEXO E – Escala Analógica de Dor (EAD)

A Escala Visual Analógica da Dor – EAD consiste em auxiliar na aferição da intensidade da dor no paciente, é um instrumento importante para verificarmos a evolução do paciente durante o tratamento e mesmo a cada atendimento, de maneira mais fidedigna. Também é útil para podermos analisar se o tratamento está sendo efetivo, quais procedimentos têm surtido melhores resultados, assim como se há alguma deficiência no tratamento, de acordo com o grau de melhora ou piora da dor.

A EAD pode ser utilizada no início e no final de cada atendimento, registrando o resultado sempre na evolução. Para utilizar a EAD o atendente deve questionar o paciente quanto ao seu grau de dor sendo que **0** significa **ausência total de dor** e **10** o nível de **dor máxima** suportável pelo paciente.

Dicas sobre como interrogar o paciente:

- Você tem dor?
- Como você classifica sua dor? (deixe ele falar livremente, faça observações na pasta sobre o que ele falar)

Questione-o:

- a) Se não tiver dor, a classificação é **zero**.
- b) Se a dor for moderada, seu nível de referência é **cinco**.
- c) Se for intensa, seu nível de referência é **dez**.

OBS.: Procure estabelecer variações de melhora e piora na escala acima tomando cuidado para não suggestionar o paciente.

ANEXO F – Questionário de dados clínicos do Setor de Endometriose do Hospital das Clínicas

Dados Clínicos da Paciente

Esta ficha se trata de algumas questões sobre aspectos de sua vida, principalmente relacionadas à sua saúde. Pedimos, por favor, que tente responder da melhor maneira possível, pois essas informações nos ajudarão a solucionar muitas dúvidas sobre o diagnóstico e o tratamento de doenças, como por exemplo, a Endometriose

Data ____/ ____/ ____ Médico: _____ Registro:

Dados Pessoais:

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/ ____/ ____ (____ anos)

Altura: _____ **Peso:** _____

Raça: () Branca () Negra () Amarela () Parda

Estado Civil: () Solteira () Estável – casada ou amasiada () Viúva () Separada

Grau de Instrução: () Nenhum () Primeiro Grau () Segundo Grau () Superior

Endereço (Rua, Número, Cidade, CEP):

_____.

_____.

Telefone para contato: () _____ - _____, ou () _____ - _____.

E-mail: _____.

Em qual dia de seu ciclo menstrual você estará no dia da cirurgia?

OU quando foi a sua ultima menstruação antes da cirurgia?

() Não sei.

() Nenhum – Motivo: _____

Antecedentes:

1) Você tem, ou teve alguma doença na sua vida? (Independente da doença atual)

() Não () Sim Se sim, qual

(quais)? _____

2) Você realiza atividade física regular(*)?

() Não () Sim

(*) Exercícios com duração de 30 minutos, com frequência de no mínimo 3 vezes por semana.

3) Você fuma?

() Não () Não mais. () Sim, _____ cigarros por dia

4) Você já passou por alguma cirurgia por Endometriose?

() Não () Sim Se sim, quantas? _____

5) Você já passou por alguma outra cirurgia no abdômen?

() Não () Sim Se sim, quantas? _____ // E quais? _____

—

6) Você toma, ou tomou, nos últimos 3 meses, algum dos medicamentos abaixo?

() Não () Anticoncepcional Oral () Zoladex () Lupron

() Mirena

() Evra () Depoprovera () Farlutal () Dimetrose

() Nuvaring

() Provera () Primolut-nor () Cerazette () Outros:

7) Você sabe de algum caso de Endometriose na sua família?

() Não () Sim Se sim, quem? (grau de parentesco)

8) Seu ciclo menstrual é regular?

() Não () Sim _____ dias de menstruação // _____ dias de intervalo.

9) Você considera seu fluxo: () Diminuído; () Normal ou () Aumentado?

10) Com quantos anos você menstruou pela primeira vez? _____ anos.

11) Você utiliza, ou utilizou na vida, algum Método**Anticoncepcional Prévio?**

() Não () Comportamental () Perlutan/Mesygina () Diu (simples) () Evra

() Camisinha () Depo-provera () Mirena () Pílula () Nuvaring

12) Você já engravidou alguma vez?

() Não () Sim Se sim, quantas delas foram:

Partos Normais _____ Partos Cesárea _____

Abortos _____ Gravidez Ectópica _____

Quadro Clínico:

1) Se você possui sintomas, cite o que você consideraria o principal deles, e por quanto tempo este a perturba:

_____ // _____ anos.

2) Baseado na seguinte escala visual analógica de dor:

Responda sobre os seguintes sintomas.

A) Você sente cólicas menstruais?

() Não

() Sim, e não necessita de medicação. [Escala de dor n° ____]

() Sim, e necessita de medicação para alivia-las. [Escala de dor n° ____]

() Sim, e necessita de medicação para alivia-las, no entanto não melhoram. [Escala de dor n° ____]

() Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro, ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas. [Escala de dor n° ____]

B) Você sente cólicas que não apresentam relação nenhuma com o seu ciclo menstrual, e que não melhoram mesmo tomando analgésicos?

() Não

() Sim, e não necessita de medicação. [Escala de dor n° ____]

() Sim, e necessita de medicação para alivia-las. [Escala de dor n° ____]

() Sim, e necessita de medicação para alivia-las, no entanto não melhoram. [Escala de dor n° ____]

() Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro, ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas. [Escala de dor n° ____]

C) Você sente dor na relação sexual?

- ☐ Não
- ☐ Na penetração.
- ☐ De profundidade (Dor no fundo da vagina). [*Escala de dor n°* ____]

D) Você sente alterações intestinais relacionadas com a menstruação?

- ☐ Não ☐ Dor, [*Escala de dor n°* ____] ☐ Sangramento
- ☐ Intestino Solto ☐ Intestino Preso
- ☐ Outros: _____

E) Você sente alterações urinárias relacionadas com a menstruação?

- ☐ Não ☐ Dor, [*Escala de dor n°* ____]
- ☐ Sangramento ☐ Aumento da frequência
- ☐ Outros, _____

3) Em relação a sua fertilidade, você:

- ☐ Nunca conseguiu engravidar.
- ☐ Possui filhos, mas atualmente não consegue engravidar.
- ☐ Não tenta engravidar (não tem vida sexual ativa, usa método anticoncepcional, etc.)
- ☐ Já possui filhos, e não deseja mais engravidar.

4) Se não consegue engravidar, isso se deve à:

- ☐ Motivo desconhecido ☐ Fator Masculino ☐ Tubário
- ☐ Insuficiência Ovariana ☐ Outros Ovulatórios ☐ Outros:
- _____

5) Você já fez algum tratamento para engravidar?

- ☐ Não ☐ Indução Ovulatória
- ☐ Inseminação Intra-uterina ☐ Fertilização In Vitro