#### **PATRICK BELLELIS**

Expressão de quimiocinas regulatórias das células *Natural Killer* e T-reguladoras em pacientes com endometriose profunda

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

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Podgaec

SÃO PAULO 2013

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

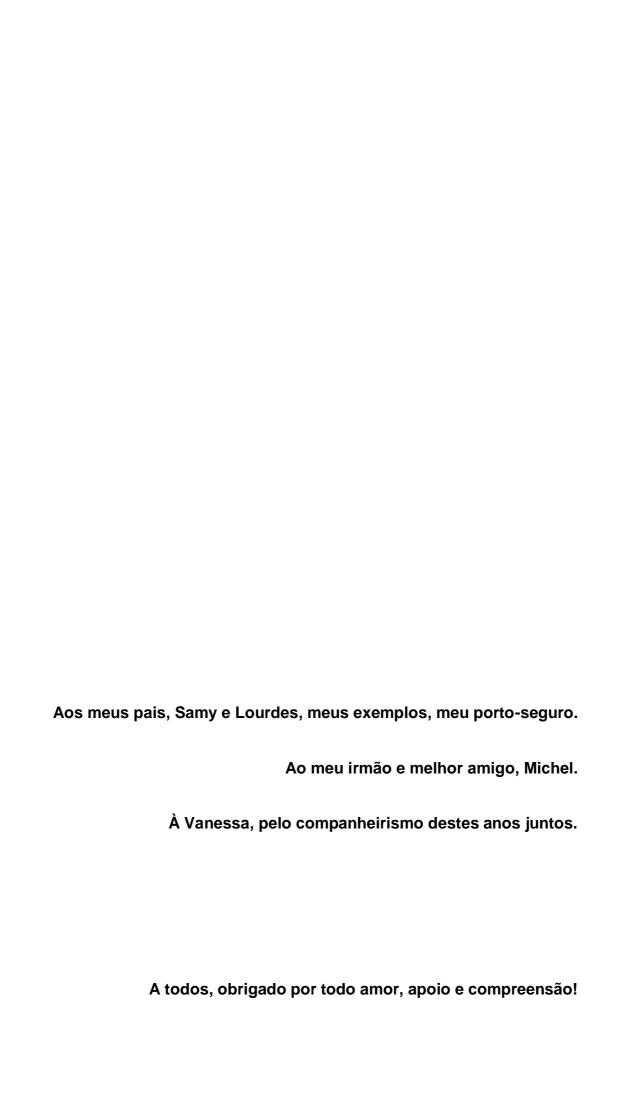
Bellelis, Patrick

Expressão de quimiocinas regulatórias de células *Natural Killer* e T-reguladoras em pacientes com endometriose profunda / Patrick Bellelis. -- São Paulo, 2013. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia. Orientador: Sérgio Podgaec.

Descritores: 1.Endometriose 2.Células matadoras naturais 3.Linfócitos T reguladores 4.Quimiocinas 5.Endométrio

USP/FM/DBD-407/13



#### **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Sérgio Podgaec, obrigado pela dedicação, orientação e amizade.

Ao Professor Doutor Maurício Simões Abrão, um exemplo de dedicação, obrigado pelos conselhos e amizade.

À Doutora Denise Frediani Barbeiro, obrigado por toda ajuda e dedicação.

Ao Professor Doutor Edmund Chada Baracat, pela importante colaboração e revisão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luiz Vicente Rizzo, pela disponibilidade de ensinar e cultivar o estudo da imunologia.

Ao Doutor Luciano Gibran, pela amizade, sugestões e contribuições.

Ao Doutor João Antônio Dias Júnior, pela amizade, sugestões e contribuições.

Ao Doutor Luiz Flávio Cordeiro Fernandes, pela amizade, sugestões e contribuições.

Às Doutoras Paula Zulian Fagundes e Lídia Hyun Joo Myung, pela amizade, carinho e ajuda.

Aos Doutores Luiz Fernando de Oliveira Henrique e Daniel Bier Caraça, pela amizade e companheirismo.

Aos Doutores Luiz Fernando Pina de Carvalho, Marco Antônio Bassi, Nicolau D'Amico Filho, Manoel Orlando Gonçalves, Leandro Accardo de Mattos, Cláudio Severino Junior, Rogério Gomes e Flávia Fairbanks por toda amizade e ajuda.

À bióloga Ana Carolina Poppe, pela amizade e ajuda.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Às pacientes. Sem elas, nada seria possível.

# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras e gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	16
3. PACIENTES E MÉTODOS	18
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	49
7. ANEXOS	51
8. REFERÊNCIAS	72
9. ARTIGO PUBLICADO	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAA - Células Apresentadoras de Antígeno

Células NK - Células Natural Killer

Células T-reg – Células T-reguladoras = Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>

CHP - Complexo de histocompatibilidade principal

DPC - Dor Pélvica Crônica

EUA – Estados Unidos da América

EVA – Escala Visual Analógica de dor

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo

IL-10 - Interleucina 10

IL-15 - Interleucina 15

LGG – Linfócitos Granulares Grandes

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E QUADROS

- **Figura 1 –** Estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* (1996).
- **Gráfico 1** Expressão gênica relativa da quimiocina CX3CL1 em endométrio tópico e lesão endometrióide de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose
- **Gráfico 2** Expressão gênica relativa da quimiocina CXCL12 em endométrio tópico e lesão endometrióide de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose
- **Gráfico 3** Expressão gênica relativa da quimiocina CCL17 em endométrio tópico e lesão endometrióide de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose
- **Gráfico 4** Expressão gênica relativa da quimiocina CCL21 em endométrio tópico e lesão endometrióide de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose.
- **Quadro 1** Representação esquemática da dinâmica de estudo.
- **Quadro 2** Representação esquemática da detecção das quimiocinas por PCR em tempo real no endométrio tópico e nas lesões de endometriose.
- **Quadro 3** Expressão gênica relativa da quimiocina CXCL9, CXCL10, CXCL11 E XCL1 em endométrio tópico e lesão endometrióide de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose.

#### LISTA DE TABELAS

- **Tabela 1** Quimiocinas humanas identificadas até o momento modificado e atualizado de Gonçalves R, Teixeira A, Campos W and Orefice F. O papel das quimiocinas nas uveítes. 2007 Arq Bras Oftalmol pp. 363-370.
- **Tabela 2**: Lista de Primers das quimiocinas CCL17, CCL21, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 e CX3CL1 utilizados no presente estudo.
- **Tabela 3 –** Descrição das características referentes ao quadro clínico das pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e mulheres sem endometriose (grupo controle).
- **Tabela 4** Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com e sem endometriose segundo as fases do ciclo menstrual, folicular e lútea
- **Tabela 5** Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de dismenorréia.
- **Tabela 6** Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de dispareunia de profundidade.
- **Tabela 7** Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de dor pélvica crônica.
- **Tabela 8** Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de alterações intestinais.

**Tabela 9** – Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo estadiamento inicial (1 e 2) e avançado (3 e 4) – ASRM 1996.

#### RESUMO

Introdução: A endometriose, condição inflamatória prevalente, associa-se a alterações da reposta imune na cavidade peritoneal e no útero. Evidências sugerem participação de mediadores inflamatórios, como as células *Natural Killer* e T-reguladoras na patogênese desta doença. A resposta destas células pode ser controlada pela atividade de algumas quimiocinas. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica das quimiocinas reguladoras das células *Natural Killer* e T-reguladoras em endométrio tópico em lesões endometrióticas de pacientes com endometriose.

Pacientes e Métodos: A expressão gênica das quimiocinas reguladoras da atividade das células *Natural Killer* (CXCL9, 10, 11, CXCL12, XCL1 e CX3CL1) e T reguladoras (CCL17 e CCL21) foi avaliada por meio de RT-PCR no endométrio tópico e lesão endometriótica de 22 pacientes com endometriose de retossigmóide; 10 pacientes com endometriose retrocervical e no endométrio tópico de 32 mulheres sem endometriose comprovada por laparoscopia para laqueadura tubária.

**Resultados**: Dentre as quimiocinas relacionadas às células *Natural Killer*, encontramos diferença estatística significativa na CX3CL1 e CXCL12, as quais foram mais expressas no foco de endometriose intestinal e retrocervical, quando comparadas ao endométrio tópico das pacientes e controles (p<0,05). Das relacionadas às células T-reguladoras, a CCL17 foi mais expressa no endométrio tópico de pacientes com lesão em retossigmóide quando comparada aos demais grupos (p<0,05).

**Conclusões**: As quimiocinas CX3CL1 e CXCL12 foram mais expressas nos focos de endometriose intestinal e a CCL17 foi mais expressa no endométrio tópico de pacientes com lesão de retossigmóide. Estes resultados sugerem que as quimiocinas CX3CL1, CXCL12 e CXCL17 participam da resposta inflamatória que ocorre na endometriose pélvica.

**Descritores**: endometriose, células matadoras naturais, linfócitos T reguladores, quimiocinas, endométrio

#### SUMMARY

**Objective**: Endometriosis is a highly prevalent inflammatory condition associated with an altered immune response in the peritoneal cavity and uterus. Evidence suggests a participation of inflammatory mediators such as natural killer (NK) and T-regulatory (T-reg) cells in the pathogenesis of this disease while the response of these cells may be controlled by the activity of some chemokines.

Patients and Methods: Gene expressions of the chemokines that regulate the activity of NK (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 and CX3CL1) and T-reg cells (CCL17 and CCL21) were evaluated using real time polymerase chain reaction (PCR) in the eutopic and ectopic endometrium of 22 patients with bowel endometriosis, 10 patients with retrocervical endometriosis and 32 controls.

**Results**: Of the chemokines associated with NK cells, the expression of CX3CL1 and CXCL12 was significantly greater in the foci of endometriosis (p<0.05). Of those associated with T-reg cells, significant differences between groups were found in CCL17. In addition, CCL17 was expressed to a higher degree in the eutopic endometrium of the patients with rectosigmoid lesions when compared to the other groups (p<0.05).

**Conclusions**: Chemokines CX3CL1 and CXCL12 were more expressed in intestinal endometriosis and CCL17 expression was higher in eutopic endometrium of the patients with rectosigmoid lesions. These results suggest that those chemokines participate in the inflammatory response that occurs in pelvic endometriosis.

**Descriptors**: endometriosis; Natural Killers cells; T regulatory limphocytes; chemokines; endometrium.

Endometriose representa uma afecção ginecológica comum, que atinge de 10 a 15% das mulheres no período reprodutivo e até 50% das mulheres com dor pélvica crônica e/ou infertilidade (Viganò, et al., 2004; Bellelis, et al., 2010). Estima-se que o número de mulheres com endometriose seja de 7 milhões nos Estados Unidos da América e de mais de 70 milhões no mundo. Em países industrializados, é uma das principais causas de hospitalização ginecológica (Vercellini, et al., 2007).

Esta doença é definida como a implantação de estroma e/ou epitélio glandular endometrial em localização extrauterina (Gao, et al., 2006), podendo comprometer diversos locais, entre eles ovários, peritônio, ligamentos úterossacros, região retrocervical, septo retovaginal, retossigmóide, íleo terminal, apêndice, bexiga e ureteres (Vinatier, et al., 2001; Abrao, et al., 2006; Vercellini, et al., 2007; Podgaec, et al., 2008).

Nisole e Donnez, em 1997, dividiram esta doença em três afecções distintas: peritoneal, ovariana e de septo retovaginal, sendo esta última chamada de endometriose infiltrativa profunda (Cornille, et al., 1990). No primeiro caso, estariam incluídas as pacientes com implantes superficiais; no segundo os cistos ovarianos típicos da doença e no terceiro caso, a endometriose infiltrativa com lesões com 5mm ou mais de espessura que podem acometer as regiões retro e paracervical, de fórnice vaginal e vagina, além dos tratos gastrointestinais e urinário.

Apesar de ser uma das doenças mais estudadas em ginecologia (Ulukus, et al., 2009), alguns aspectos continuam sendo alvo de pesquisa, destacando-se a busca pela etiopatogenia (Abrao, et al., 2006; Podgaec, et al., 2008; Ascien & Velasco, 2013). Duas correntes principais de hipóteses etiopatogênicas são citadas há quase um século: a teoria da metaplasia celômica (Meyer, 1919) e a da menstruação retrógrada (Sampson, 1927). Esta segunda teoria seria possível por influência de um ambiente hormonal favorável e de fatores imunológicos que não eliminariam as células endometriais da cavidade peritoneal (Harada, et al., 2001; Podgaec, et al., 2007; Berbic & Fraser, 2013).

Pacientes portadoras de endometriose podem ser assintomáticas ou apresentarem queixas clínicas em diferentes intensidades, sendo as principais dismenorréia, dor pélvica crônica, infertilidade, dispareunia de profundidade e sintomas intestinais e urinários cíclicos, como dor ou sangramento ao evacuar ou urinar durante o período menstrual. A demora do diagnóstico da endometriose pode ser explicada pela inespecificidade do quadro clínico e, eventualmente, pela falta de correlação entre sintomas e gravidade da doença (Arruda, et al., 2003; Hemmings, et al., 2004; Kashima, et al., 2004; Heilier, et al., 2007).

## Considerações gerais sobre os aspectos imunológicos

Nos últimos anos, muito tem se estudado acerca dos fatores imunológicos na patogênese da endometriose e muitas anomalias foram encontradas (Berkkanoglu and Arici, 2003; Podgaec, et al., 2007; Fairbanks, et al., 2009; Berbic & Fraser, 2013), sendo que o principal mecanismo avaliado é complementar à teoria da menstruação retrógrada. Por algum motivo, ainda indeterminado, as células endometriais que adentraram à cavidade endometrial não seriam eliminadas e deste modo, seria permitido a elas se implantarem e desenvolverem a doença (Harada, et al., 2001; Berbic & Fraser, 2013).

As células que caem na cavidade abdominal deveriam ser identificadas como antígenos e serem submetidas à resposta imune local. Algumas células, como os macrófagos, funcionam como apresentadoras de antígenos aos linfócitos T através do complexo de histocompatibilidade principal (CHP). O CHP pode ser classe I ou II, sendo que no primeiro caso atrai os linfócitos T citotóxicos e no segundo os lintócitos T *helper* (auxiliadores). Os citotóxicos secretam substâncias letais que provocam a morte da célula-alvo e os T-*helper* secretam citocinas que induzem mecanismos e fatores que podem levar à morte celular (Abbas, et al., 2011).

Deste modo, existem dois tipos de resposta imune: a inata e a adaptativa ou adquirida. Em um dos mecanismos da resposta inata,quando um antígeno invade o organismo, um grupo de células tenta destruí-lo por

meio da fagocitose. Estas células podem ser monócitos, macrófagos, neutrófilos e/ou células *Natural Killer*. Este tipo de reconhecimento é inespecífico, pois as células fagocitam vários tipos de micro-organismos e fazem parte da primeira linha de defesa do organismo. Já a adaptativa, é uma resposta específica e conta com a atuação dos linfócitos, que reconhecem o patógeno invasor (Abbas, et al., 2011).

Existem vários tipos de linfócitos, dentre os quais destacam-se os linfócitos B, que produzem anticorpos que se ligam ao antígeno para eliminálo, os linfócitos T, que estão envolvidos na produção de linfócitos B, auxiliam na fagocitose, atuam na eliminação antigênica e na replicação da resposta imune e as células NK que não apresentam em sua superfície marcadores que são encontrados nas células B, nem os que caracterizam as células T. No sangue circulante, 10-15% dos linfócitos são NK. Estas, por sua vez, atacam as células neoplásicas e células infectadas por vírus sem necessidade de estímulo prévio. (Robertson, 2002; Abbas, et al., 2011). Nesse tópico, o balanço entre imunidade e tolerância é importante para manter a homeostase imune, onde muitos mecanismos são utilizados para manter a resposta imune sob controle, incluindo-se a atividade das células Natural Killer (NK) e T-reguladoras (T-reg) (Ota, et al., 2002; Qin, et al., 2008; Engel and Kronenberg, 2012) e do importante papel de outros mediadores da resposta imune como as quimiocinas (Clore and Gronenborn, 1995; Rollins, 1997).

#### Quimiocinas

As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, de aproximadamente 8 a 12kD, que estimulam o movimento dos leucócitos (quimiocinese) e regulam a migração destes do sangue para os tecidos (quimiotaxia) sendo, portanto, citocinas quimiotáticas (Clore and Gronenborn, 1995; Rollins, 1997). As citocinas, por sua vez, são mensageiros do sistema imunológico. Correspondem a um extenso grupo de moléculas que atuam emitindo sinais entre as células durante o desencadeamento da resposta imune, atuando em diferentes etapas desta resposta (Abbas, et al., 2011). As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas

por leucócitos em resposta a estímulos externos e as quimiocinas que regulam o tráfego celular entre os tecidos são produzidas e constituídas por várias células, como endotélio, fibroblastos e megacariócitos (Moser and Loetscher, 2001; Abbas, et al., 2011).

As moléculas da estrutura das quimiocinas possuem duas alças internas de dissulfeto e são divididas em duas subfamílias dependendo da posição de seus resíduos de cisteína aminoterminais imediatamente adjacentes (cys-cys) ou separados por um aminoácido (cys-X-cys). Estas diferenças se correlacionam com a organização de duas subfamílias principais (CC e CXC) em aglomerados separados de genes. Cada subfamília possui seu próprio receptor e tem funções diferenciadas uma da outra. As quimiocinas CXC são quimiotáxicas para neutrófilos, enquanto as CC não agem neste último grupo celular, mas atraem monócitos, basófilos e linfócitos. Uma terceira família tem como única representante a fractalquina (CX3CL1), em que a característica estrutural é a presença de duas cisteínas separadas por três aminoácidos (CX3C) e tem por função a quimiotaxia de linfócitos T e monócitos, além de promover a adesão de leucócitos com células endoteliais. Finalmente, a quarta família, que representantes, a linfotactina  $\alpha$  (XCL1) e linfotactina  $\beta$  (XCL2), possui uma única cisteína (família C) que promove a atração de células T. Esta classificação foi realizada pela International Union of Immunological Societies/World Health Organization Subcommittee on Chemokine Nomenclature (Bacon, et al., 2003).

Quimiocinas atuam por meio de receptores trans-membranas de alta afinidade expostos na superfície de células circulantes. Onze receptores diferentes para quimiocinas CC (chamadas CCR1 a CCR11) e seis para quimiocinas CXC (chamadas CXCR1 a CXCR6) foram identificados (Moser and Loetscher, 2001; Raman, et al., 2011). Os receptores de quimiocinas possuem sítios de ligação que podem ser específicos (CCR9, CXCR6), mas, comumente, o mesmo receptor pode ser alvo de ligação de várias quimiocinas do mesmo grupo (Tabela 1 -Gonçalves, et al., 2007).

Os receptores de quimiocinas são expressos em leucócitos, com o maior número de receptores diferentes vistos em linfócitos T. A expressão dos receptores de quimiocinas pode definir subtipos de linfócitos T, como Th1, Th2, Th17 ou mesmo Treg (Ekman, et al., 2013). Além disso, linfócitos T periféricos maduros expressam diferentes receptores de quimiocinas dependendo do seu fenótipo funcional. Estas diferenças determinam, em parte, o tipo de resposta imune que irá se desenvolver em um sítio de inflamação (Sallusto, et al., 1998; Bacon, et al., 2003; Ekman, et al., 2013).

**Tabela 1** - Quimiocinas humanas identificadas até o momento – modificado e atualizado de Gonçalves R, Teixeira A, Campos W and Orefice F. O papel das quimiocinas nas uveítes. 2007 Arq Bras Oftalmol pp. 363-370.

Família		Nome Original	Receptores	Localização no Gene
CXC	CXCL1	GROα / MIP-2	CXCR2	24q21
	CXCL2	GRO β	CXCR2	4q21
	CXCL3	GRO γ	CXCR2	4q21
	CXCL4	PF-4	CXCR3	4q21
	CXCL5	ENA-78	CXCR2	4q21
	CXCL6	GCP-2	CXCR2	24q21
	CXCL7	NAP-2	CXCR2	4q21
	CXCL8	IL-8	CXCR2+CXCR1	24q21
	CXCL9	MIG	CXCR3	4q21
	CXCL10	IP-10	CXCR3	4q21
	CXCL11	I-TAC	CXCR3	4q21
	CXCL12	SDF-1	CXCR4	10q11.21
	CXCL13	BCA-1	CXCR5	4q21
	CXCL14	BRAK	Não determinado	5q31.1
	CXCL15	Lungkine	Não determinado	Não determinado
	CXCL16	CXCL16	CXCR6	17p13
СС	CCL1	I-309	CCR8	17q11
CC	CCL2	MCP-1	CCR2	17q12
	CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5	17q12
	CCL4	MIP-1β	CCR5	17q12
	CCL4	RANTES	CCR5	17q12 17q12
	CCL6	C10	Não determinado	Não determinado
	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	17q11
	CCL7	MCP-2	CCR3, CCR5	17q11 17q11
	CCL9	MIP-1γ	Não determinado	Não determinado
	CCL10	CCL10	Não determinado	Não determinado
	CCL10	Eotaxin	CCR3	17q11
	CCL11	MCP-5	CCR2	Não determinado
	CCL12	MCP-4	CCR2, CCR3	
	CCL13	HCC-1	CCR1, CCR5	17q11
	CCL14 CCL15	HCC-2/MIP-1δ/Leotactin-1		17q12
			CCR1, CCR3	17q12
	CCL15	HCC-4/LEEC TARC	CCR1, CCR2 CCR4	17q12
	CCL17 CCL18	PARC/DC-CK1	Não determinado	16q13 17q12
	CCL18			
		MIP-3β/ELC	CCR7	9p13.3
	CCL20	LARC/MIP-3a	CCR6	2q36.3
	CCL21	SLC/6Ckine	CCR7	9p13.3
	CCL22	MDC	CCR4	16q13
	CCL23	MPIF-1	CCR1	17q12
	CCL24	Eotaxin-2/MPIF-2	CCR3, CCR5	7q11
	CCL25	TECK	CCR9	19q13.3
	CCL26	Eotaxin-3	CCR3	7q11
	CCL27	ESkine/MCC/Ctack	CCR10	9p13.3
VC	CCL28	MEC	CCR3, CCR10	5p12
XC	XCL1	Linfotactina $\alpha$	XCR1	1q24
CV C	XCL2	Linfotactina β	XCR1	1q24
CX <sub>3</sub> C	CX <sub>3</sub> CL1	Fractalkine	CX₃CR1	16q13

Após serem ativados pelas quimiocinas, os receptores das quimiocinas iniciam uma complexa cascata de sinalização que leva à ativação de moléculas de integrina na superfície celular. As integrinas são moléculas essenciais para que ocorra a adesão das células de defesa aos tecidos envolvidos nos processos inflamatórios (Cameron and Kelvin, 2003).

Além das funções como agente quimiotático de linfócitos, os estudos com as quimiocinas e seus receptores revelaram outros importantes papéis para estas moléculas, como a sua relação com metástases tumorais e, contraditoriamente, a inibição do crescimento de células tumorais, assim como infecções e doenças autoimunes, como artrite reumatóide e esclerose múltipla (Loetscher and Moser, 2002; Dong, et al., 2003; Raman, et al., 2011).

As quimiocinas exercem um papel soberano na progressão tumoral. Processos inflamatórios crônicos promovem a formação tumoral e tanto as células tumorais como as células do estroma, produzem quimiocinas e citocinas. Estas atuam tanto por mecanismos autócrinos, como parácrinos para sustentar o crescimento da célula tumoral, induzir a angiogênese e facilitar a diminuição da vigilância imunológica (Raman, et al., 2007).

As quimiocinas e seus receptores também têm papel importante no desenvolvimento e manutenção da imunidade inata e adaptativa (Raman, et al., 2007) Além disso, atuam no processo de cicatrização de feridas e angiogênese (Raman, et al., 2011). Quando o papel fisiológico das quimiocinas é subvertido ou cronicamente ampliado, a doença pode se desenvolver. Como estão envolvidas na fisiopatologia da inflamação crônica, tumorigênese e metástase, assim como nas doenças autoimunes, tem sido avaliado o uso potencial de antagonistas de quimiocinas para terapia salvo apropriadas (Raman, et al., 2011). Apesar da ação das quimiocinas na modulação da atividade de outras células do sistema imune ainda não ter sido completamente elucidado, algumas de suas ações em outros mediadores imunológicos como as células T-reguladoras e NK já são bastante conhecidas (Qin, et al., 2008; Robertson, 2002).

## Células T-reguladoras

O balanço entre imunidade e tolerância é importante para manter a homeostase imune. Muitos mecanismos são utilizados para manter a resposta imune sob controle, como a anergia de linfócitos T, a apoptose e a ignorância imunológica (Abbas, et al., 2011). Um quarto mecanismo de tolerância periférica é a supressão ativa por células reguladoras como células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (T-reg) que expressam, constitutivamente, as moléculas CTLA-4, GITR e Foxp3 (Fontenot, et al., 2005), células Th3 produtoras de TGF-beta, células Tr1 produtoras de IL-10 e células T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (Maloy and Powrie, 2001; Askenasy, et al., 2008). As células T reguladoras foram primeiramente descritas no início dos anos 70, mas como fatores supressores solúveis hipotéticos não puderam ser identificados em nível molecular e marcadores celulares apropriados não eram conhecidos (Sakaguchi, et al., 1995). O conceito de célula T supressora permaneceu esquecido por um longo tempo. A descoberta de Sakaguchi e colaboradores de que a transferência adotiva de uma população de células T depletadas da molécula CD25 induzia uma série de doenças autoimunes órgão-específicas em recipientes imunodeficientes, colocou o modelo de células T reguladoras novamente no foco da imunologia (Sakaguchi, et al., 1995). As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> foram denominadas células T reguladoras (T-reg) e, desde então, as mesmas têm sido intensivamente estudadas (Long and Buckner, 2011; Filaci, et al., 2011; Selmi, 2011)

Inicialmente, acreditava-se que eram células derivadas do timo (Seddon and Mason, 2000), entretanto, depois verificou-se que essas células também podem ser geradas na periferia (Waldmann and Cobbold, 2001). As células T-reg podem ser ativadas por antígenos próprios ou não próprios e, uma vez ativadas, podem suprimir células T de maneira antígeno não específica (Jonuleit and Schmitt, 2003; Sakaguchi, et al., 2010). Os efeitos supressivos dessas células não são restritos ao sistema imune adaptativo (células T e B), mas podem também influenciar a ativação e a função de células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos, células dendríticas). Após a ativação do TcR (receptor de células T para antígeno de superfície),

as células T-reg naturais inibem respostas imunes *in vivo* e *in vitro* de maneira antígeno não específica, CHP não restrito e via um processo independente de células apresentadoras de antígenos (CAA). Células T-reg adaptativas são induzidas por antígenos, desenvolvem-se na periferia e exercem sua função por meio da secreção de citocinas inibitórias (como IL-10 e TGF-β) ou tolerizando CAA por interações célula-célula (Maloy and Powrie, 2001; Selmi, 2011).

O Foxp3 foi identificado como um marcador molecular específico para células T-reg e sua expressão é essencial para o desenvolvimento e a função desta célula. A expressão ectópica de Foxp3 em linfócitos T convencionais pode conferir atividade supressora aos mesmos e estes também passam a apresentar altos níveis de CD25. Aparentemente, o Foxp3 age estabelecendo e mantendo o programa genético da T-reg e funciona como um regulador negativo da ativação de células T e talvez como efetor transcricional de programas de citocinas anti-inflamatórias (Fontenot, et al., 2005; Filaci, et al., 2011; Josefowicz, et al., 2012).

No entanto, a identificação das células T-reg permanece problemática porque não existe consenso acerca de seus marcadores. Algumas evidências sugerem que todos os marcadores atualmente utilizados (CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3. CD127 e o próprio Foxp3) podem representar marcadores gerais de linfócitos T, ao invés de serem realmente específicos para as células T-reg. (Askenasy, et al., 2008; Corthay, et al., 2009). Apesar de que as evidências mais recentes, assim como uma grande revisão sistemática sobre o tema, demonstraram a especificidade de ação do Foxp3 como marcador específico e efetor transcricional das células T-reg (Josefowicz, et al., 2012; Peterson, et al., 2012)

Sabe-se que em humanos, as células T-reg são reguladas pelas quimiocinas CCL17 e CCL21 (ligantes de CCR4 e CCR7) que podem modular e expressar a sua atividade nos tecidos (Qin, et al., 2008).

#### Células Natural Killer

As células *Natural Killer* (NK) estão entre as principais células do sistema imune dos vertebrados. O papel das células NK é análogo ao de células T citotóxicas na resposta imune adaptativa. As células NK fornecem respostas rápidas para as células infectadas por vírus e respondem à formação de tumores, começando a atuar cerca de 3 dias após a infecção. Sendo assim, desempenham importante papel na resposta inata podendo diferenciar células infectadas por vírus, células neoplásicas e células normais (Sikora, et al., 2011; Rudensky, 2011; Vivier, et al., 2011).

As células NK são linfócitos e possuem a habilidade de eliminar células-alvo de acordo com o reconhecimento do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) expresso em suas superfícies. Elas reconhecem as células que expressam o CHP classe I como próprias, sendo destruídas aquelas células que não o apresentam. Foram nomeadas *natural killers* por causa da noção inicial de que não necessitam de ativação para eliminar as células sem marcadores *self* do CHP classe I. São definidas como linfócitos granulares grandes (LGG) e constituem o terceiro tipo de células diferenciadas do antepassado comum linfóide que gera linfócitos B e T. Elas podem também contribuir, por meio da produção de citocinas, na resposta imune adaptativa contra patógenos intracelulares e células malignas (Robertson, 2002; Rudensky, 2011; Vivier, et al., 2011).

Além do conhecimento que as células NK são efetores da imunidade inata, uma pesquisa revelou informações sobre a atividade tanto na ativação quanto na inibição dos receptores das células NK, os quais desempenham importante papel, tanto na função de auto-tolerância quanto na sustentação da atividade das células NK (Arina, et al., 2007). Elas também desempenham um papel na resposta imune adaptativa. Numerosas experiências têm trabalhado para demonstrar a sua capacidade de facilmente adaptar-se ao meio ambiente de forma quase que imediata e formular memória imunológica antígeno específica, fundamental para responder a infecções secundárias com o mesmo antígeno (Vivier, et al., 2011). A capacidade das células NK para atuar tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa tem se tornado

objeto de pesquisa importante, na tentativa de se utilizar seus resultados em potenciais terapias (Arina, et al., 2007).

Nos humanos células NK migram em resposta a ligantes conhecidos das quimiocinas CXCR3 (CXCL9, 10, 11) e CXCR4 (CXCL12) e a quimiotaxia de células NK é estimulada por XCL1 e CX3CL1 (Robertson, 2002).

## Considerações sobre endometriose, células NK e células T-reg

Devido à função das células NK e T-reg, postula-se que elas desempenhem importante papel na gênese da endometriose.

A primeira publicação em inglês avaliando a relação das células NK e endometriose vem da Bélgica, em 1991(Oosterlynck, et al., 1991). Este grupo avaliou o percentual de células NK em relação à subpopulação linfocitária em sangue periférico e sua citotoxicidade em relação ao endométrio tópico das mesmas pacientes. A atividade das células NK e a citotoxicidade contra o endométrio tópico autólogo estava diminuída nas pacientes com endometriose e, além disto, se correlacionava com a severidade da doença. Após avaliação *in vitro* puderam observar que a citotoxicidade das células NK era menor nas pacientes com endometriose quando comparadas às mulheres sem a doença e que esta diminuição era menor, quanto maior fosse o estadiamento da doença. O mesmo grupo ainda relatou uma diminuição da atividade das células NK no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Oosterlynck, et al., 1992).

Da mesma forma, Kikuchi et al, (Kikuchi, et al., 1993) avaliaram o percentual de células NK em sangue periféricos de 10 mulheres com endometriose, 10 mulheres com miomas e 9 mulheres hígidas e encontraram uma diminuição do percentual de células NK nas portadoras de endometriose.

Dias Jr et al., em 2012, realizaram citometria de fluxo em sangue periférico de 155 mulheres, sendo 100 pacientes com endometriose e 55 mulheres submetidas à laqueadura tubária. Estas mulheres foram

submetidas à laparoscopia e encontraram diferenças nas concentrações de células NK em pacientes com endometriose profunda. Estas pacientes apresentaram uma maior concentração de células NK no sangue periférico (15,3%), em comparação às pacientes sem endometriose (9,8%). Ao avaliarem as pacientes com estádio avançado da doença (especialmente àquelas com doença de retossigmóide), esta diferença foi ainda maior (19,8% vs. 10,3%).

Apesar de resultados díspares na literatura, sugere-se que as células NK efetivamente participam do *clearance* das células endometriais regurgitadas para a cavidade abdominal, durante o período menstrual (Maeda, et al., 2002; Berbic & Fraser, 2013).

Em relação às células T-reguladoras, Berbic et al. (Berbic, et al., 2010) demonstraram um aumento da expressão de Foxp3, em avaliação imunoistoquímica, no endométrio tópico de pacientes com endometriose durante a fase secretora do ciclo menstrual. Os autores postularam haver diminuição da habilidade dos leucócitos em reconhecer e marcar efetivamente antígenos endometriais regurgitados pela menstruação, permitindo sua sobrevivência e, desta forma, a capacidade de se implantar em sítios ectópicos. Além disto, a variabilidade da expressão do Foxp3 nestes sítios ectópicos, teve correlação com a fase do ciclo menstrual e com as características e estádios de cada lesão.

Braundmeier et al. (Braundmeier, et al., 2012), utilizaram um modelo animal de endometriose (*Papio anubis*) e avaliaram a expressão de Foxp3 no sangue periférico (imunoistoquímica) e endométrio tópico (RT-PCR) de animais controles e com endometriose induzida. A expressão de Foxp3 e células T-reg também estava reduzida no endométrio tópico comparada com os animais controles, ao passo que estes parâmetros estavam aumentados no endométrio ectópico quando comparados com o endométrio tópico.

Assim como na endometriose, no câncer parece haver um distúrbio da resposta imune e algumas pesquisas têm tentado demonstrar que a inibição das células T-reg poderia permitir uma melhor resposta às terapias

imunológicas contra a doença. Existem evidências de que certos regimes de quimioterapia são capazes de mediarem seus efeitos, pelo menos em parte, por meio da inibição das células T-reg. Já foi demonstrado que a ciclofosfamida e o paclitaxel acarretam uma diminuição da população de células T-reg maior do que outras células do sistema imune, diminuindo também seu papel inibitório e possibilitando assim uma resposta mais adequada das células do sistema imune (Menetrier-Caux, et al., 2012).

Podgaec et al, 2012, avaliaram 98 mulheres, sendo 70 com endometriose e 28 sem a doença. Primeiramente, foram isolados os linfócitos do fluído peritoneal e as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> por meio da citometria de fluxo. A seguir, foi utilizado o RT-PCR para se verificar a expressão de Foxp3 nestas células. De todos os linfócitos isolados no fluído peritoneal das mulheres com endometriose, 36,5% (mediana) foram CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, ao passo que nas mulheres sem doença, somente 1,15% (mediana). O resultado da expressão do Foxp3 foi semelhante, sendo 50 (pacientes com endometriose) *versus* 5 (grupo controle).

Assim, para a hipótese do presente estudo, salientamos que a atuação deste grupo de mediadores da resposta inflamatória parece ter importante papel na coordenação da resposta imune contra as células endometriais. Como demonstrado por Dias et al., 2012, as células NK estão aumentadas no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda e por Podgaec et al, 2012, mostraram que as células T-reg também estão aumentadas no fluido peritoneal das pacientes com endometriose, provavelmente, as células endometriais, quando presentes na cavidade peritoneal não seriam eliminadas desse local impróprio por ação deficiente em várias etapas da resposta imune. Talvez o aumento das células NK seja compensatório pela diminuição em sua citotoxicidade. Ou ainda que o aumento das células T-reg poderia bloquear a resposta imune e, desta forma, permitir a implantação das células endometriais. Este aumento poderia ainda ser compensatório, para bloquear a exacerbação da resposta imune contra a instalação da endometriose.

Sabemos que macrófagos e células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos, podem estar ativadas e aumentadas, porém, suprimidas pela ação das células T-reg aumentadas (Corthay, 2009; Peterson, 2012).

Sabendo que as células NK são reguladas pelas quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 e CX3CL1 e as T-reguladoras pelas quimiocinas CCL17 e CCL21, o estudo destes mediadores que modulam a atividade e migração destas células pode permitir uma melhor compreensão de mais uma etapa da resposta imune e ainda contribuir, no futuro, para eventuais tratamentos desta doença. Se estas células estão aumentadas, as quimiocinas que regulam sua migração devem ter um expressão diferenciada nas pacientes com endometriose.

# 2. OBJETIVOS

## Objetivo principal

 Avaliar a expressão gênica de quimiocinas reguladoras da atividade de células Natural Killer (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 e CX3CL1) e T-reguladoras (CCL17 e CCL21) no tecido endometrial tópico e na lesão endometriótica de pacientes com endometriose profunda (retossigmóide e retrocervical).

## Objetivos específicos

- Relacionar, em pacientes com endometriose profunda, a expressão gênica das quimiocinas reguladoras da atividade de células Natural Killer e T-reguladoras com:
  - a. fase do ciclo menstrual;
  - b. quadro clínico;
  - c. estadiamento da endometriose (ASRM, 1996);
  - d. localização da doença: retrocervical e retossigmóide.

3. PACIENTES E MÉTODOS

#### 3.1 Pacientes

#### 3.1.1 Local de estudo e pacientes

O estudo foi realizado no Setor de Endometriose da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As pacientes foram divididas em três grupos: pacientes com endometriose de retossigmóide confirmada histologicamente (grupo A), pacientes com endometriose retrocervical confirmada histologicamente (grupo B) e pacientes sem endometriose submetidas à cirurgia de laqueadura tubária como método de planejamento familiar (grupo C). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (nº0025/10). As pacientes foram previamente informadas sobre o estudo e o material foi coletado após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, pelas mesmas. A coleta das amostras respeitou os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e pelas Comissões de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da instituição.

#### 3.1.2 Número de paciente estudados

Trata-se de estudo caso-controle prospectivo exploratório, com um n de 64 pacientes entre casos e controles, que foi o número de casos operados consecutivamente em um ano.

#### 3.1.3 Critérios de inclusão/exclusão

Determinou-se para os grupos A e B os seguintes critérios de inclusão:

- Idade entre 18 e 40 anos;
- Ciclos menstruais eumenorreicos com o intervalo entre os ciclos variando de 26 a 34 dias;
- Endometriose comprovada histologicamente em região de retossigmóide (A) ou retrocervical (B);

- Ausência de doenças autoimunes comprovadas por anamnese, exame físico e laboratoriais quando necessário;
- Não utilização de terapêutica hormonal nos três meses que antecederam a cirurgia, incluindo análogos de GnRH, progestagênios e contraceptivos hormonais orais.

Para o grupo C, foram selecionadas mulheres respeitando os mesmos critérios acima, com exceção da confirmação histológica de endometriose.

#### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Dinâmica do Estudo

Todas as pacientes foram avaliadas do ponto de vista clínico pela história, exame físico e de imagem (ultrassonografia pélvica e/ou transvaginal e ressonância magnética, quando apropriado), de acordo com a indicação clínica para confirmação da suspeita de endometriose e posterior indicação cirúrgica.

A decisão sobre a realização de tratamento clinico ou cirúrgico depende, de forma preponderante, do quadro clínico, assim como do desejo reprodutivo, idade da paciente e das características das lesões. No grupo A, as pacientes foram submetidas à cirurgia quando da presença de lesão em retossigmóide à ultrassonografia e que não apresentaram melhora clínica após 6 a 12 meses de tratamento, ou ainda, quando havia quadro sugestivo de suboclusão intestinal. No grupo B, foram encaminhadas para cirurgia as pacientes com ultrassom sugestivo de lesões retrocervicais e que apresentavam falha do tratamento clínico após 6 a 12 meses de tentativa.

Com relação ao grupo C, foram encaminhadas para cirurgia de laqueadura tubária, pacientes com prole constituída e sem desejo reprodutivo. Durante a cirurgia foi possível confirmar a ausência de lesões de endometriose.

No momento da vídeo-laparoscopia foi anotado o dia do ciclo menstrual, sendo considerado como fase folicular do primeiro ao décimo quarto dia do ciclo e fase lútea do décimo quinto até o último dia do ciclo menstrual.

Os fragmentos de endométrio das participantes do estudo foram coletados com cureta de Pipelle antes do início da vídeo-laparoscopia. Os fragmentos das lesões de endometriose foram coletados apos a exérese dos mesmos durante o procedimento terapêutico. Foi coletado aproximadamente 3cm² de tecido por paciente.

Cada fragmento coletado foi dividido em duas partes iguais: a primeira foi armazenada em tubo com RNAlatter (Qiagen® -Ontario- CA code 76106) a -80°C e a segunda encaminhada para o Departamento de Anatomia Patológica, para seguir os trâmites habituais do diagnóstico histológico da doença.

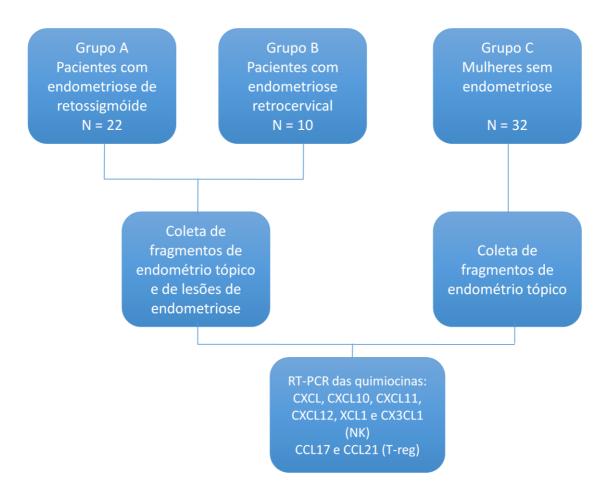
#### 3.2.2 Quadro Clínico

Todas as pacientes foram questionadas sobre os seis sintomas relacionados à endometriose:

- 1. Dismenorréia dor em cólica durante o período menstrual;
- 2. Dispareunia de profundidade dor pélvica durante o ato sexual;
- Dor pélvica acíclica dor pélvica sem relação com o período menstrual, constante, sem melhora com o uso de analgésicos;
- Infertilidade dificuldade para um casal, sem o uso de métodos contraceptivos, engravidar por pelo menos um ano de tentativa, com vida sexual ativa (duas ou mais relações por semana);
- Alteração intestinal cíclica dor e/ou sangramento à evacuação no período menstrual;

 Alteração urinária cíclica – dor e/ou sangramento à micção no período menstrual.

Todos os quadros álgicos tiveram sua intensidade avaliada de acordo com uma escala analógica de dor (anexo 1).



Quadro 1 – Representação esquemática da dinâmica de estudo

#### 3.2.3 Estadiamento da Endometriose

As pacientes do grupo A foram estadiadas segundo a classificação da American Society for Reproductive Medicine (1996) (Figura 1). Para fins estatísticos, agrupamos os estádios I e II como "estádio inicial" e os estádios III e IV como "estádio avançado".

**Figura 1**: Estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* (1996)

Estádio I (mínima): 1-5 Estádio II (leve): 6-15 Estádio III (moderada): 16-40 Estádio IV (severa): > 40

	ENDOMETRIOSE	< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm	
PERITÔNIO	Superficial	1	2	4	
	Profunda	2	4	6	
OVÁRIO	D superficial	1	2	4	
	Profunda	4	16	20	
OVARIO	E superficial	1	2	4	
	Profunda	4	16	20	
	ERAÇÃO DO FUNDO ACO POSTERIOR	Parcial 4		Completa 40	
OVÁRIO	ADERÊNCIAS	< 1/3 Envolvido	1/3 - 2/3 Envolvidos	> 2/3 Envolvidos	
	D Velamentosa	1	2	4	
	Densa	4	8	16	
	E Velamentosa	1	2	4	
	Densa	4	8	16	
	D Velamentosa	1	2	4	
TROMPA.	Densa	4*	8*	16	
RUMPA	E Velamentosa	1	2	4	
	Densa	4*	8*	16	

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

Porcentagem de implantes:	Porcent	agem (	de imp	lantes:
---------------------------	---------	--------	--------	---------

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: \_\_\_\_





# 3.3 Detecção das quimiocinas por PCR em tempo real no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas

#### • Extração de RNA

Células do endométrio tópico e lesão endometriótica, obtidas durante o procedimento cirúrgico dos pacientes e dos indivíduos controle, foram descongeladas, pulverizadas em gral com nitrogênio líquido e submetidas à extração do RNA total, por meio da técnica descrita por Chomizinski and Sacchi em 1987, a qual utiliza solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total.

O RNA obtido dos fragmentos de endométrio e das lesões endometrióticas foi extraído por meio da adição de 1ml de trizol, incubação à temperatura ambiente por 5 minutos e, após adição de 0,2 ml de clorofórmio, agitação vigorosa por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente, por 3 minutos. A separação de fases foi feita por centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. O RNA presente na fase aquosa (superior) foi transferido para outro tubo e precipitado pela adição de 0,5 ml de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 1 ml de etanol a 75% (com o uso de vórtex), centrifugado a 7000g por 5 minutos, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água contendo DEPC (dietilpirocarbonato). Após este procedimento, o material foi mantido a – 80°C, para manutenção da integridade das amostras.

#### Quantificação de RNA

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado por meio de leitura em espectrofotômetro (Nano Vue plus, GE – New Jersey, USA) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado por meio da análise da relação entre 260 e 280nm, sendo considerados valores entre 1,7 e 2,0 (Sambrook, 1989).

As amostras de RNA foram tratadas com DNAse I (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para descartar possível contaminação com DNA.

Além disto, uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio para visualização da integridade das amostras.

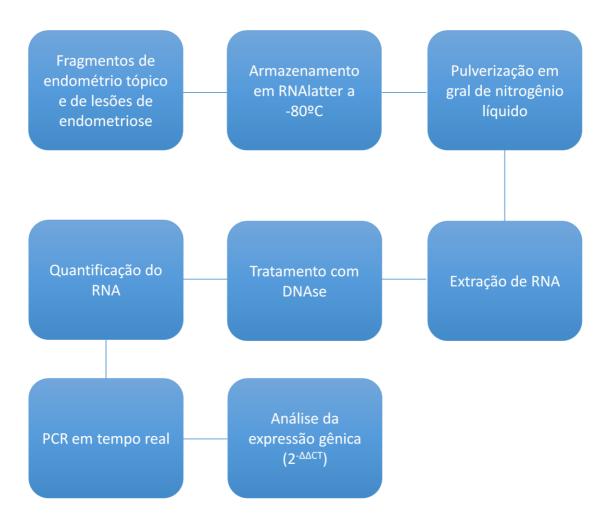
## • Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

A expressão dos genes foi avaliada por PCR em tempo real utilizando 100ng de RNA em equipamento Step One (Applied Biosystems – Foster City, CA – USA) com o kit Super Script III Platinum SYBR® Green One-Step qRT.PCR (11736-051- Invitrogen Carlsbad, CA - USA) que contem SYBR® Green I como fluoróforo. A quantificação da expressão gênica foi realizada por 2-ΔΔCT (Livak *et AL*, 2001), usando o gene da Beta2-microglobulina como controle interno. As seqüências dos *primers* específicos que foram utilizados, assim como as temperaturas de hibridização e tamanhos dos fragmentos encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2**: Lista de Primers das quimiocinas CCL17, CCL21, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 e CX3CL1 utilizados no presente estudo.

GENE	GENE BANK	SENSE	REVERSE	PB
CCL17	NM_002987	ACTGAAGATGCTGGCCCTGGTC	AAACGATGGCATCCCTGGAGC	182
CCL21	NM_002989	CCCAGCTATCCTGTTCTTGC	TCAGTCCTCTTGCAGCCTTT	201
CXCL9	NM_002416.1	TGCTGGTTCTGATTGGAGTG	TTTGGCTGACCTGTTTCTCC	246
CXCL10	NM_001565	CTGTACGCTGTACCTGCATCA	TTCTTGATGGCCTTCGATTC	172
CXCL11	NM_005409	AGAGGACGCTGTCTTTGCAT	TGGGATTTAGGCATCGTTGT	154
CXCL12	AY802782	GTCAGCCTGAGCTACAGATGC	CTTTAGCTTCGGGTCAATGC	162
XCL1	NM_002995	TGGCATCTGCTCTCACTG	ATTTCCTGTCCATGCTCCTG	236
CX3CL1	NM002996	TCTGCCATCTGACTGTCCTG	CTGTGCTGTCTCGTCTCCAA	169

A representação esquemática de todo o processo da detecção da expressão gênica das quimiocinas pelo PCR em tempo real no endométrio tópico e nas lesões endometrióticas se encontra no quadro 2.



**Quadro 2** – Representação esquemática da detecção das quimiocinas por PCR em tempo real no endométrio tópico e nas lesões de endometriose.

### 3.4 – Método Estatístico

Para responder aos objetivos do estudo, as características quantitativas foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo). A idade foi comparada entre os grupos com uso do teste ANOVA (Neter, et. al., 1996). Para comparação das queixas clínicas entre os grupos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas não paramétricas (Neter, et. al., 1996), para identificar entre quais grupos ocorre a diferença.

As características qualitativas das mulheres foram descritas segundo grupos com uso de freqüências absolutas e relativas, verificada a existência de associação entre as medidas e os grupos, com uso de testes da razão de verossimilhanças (Kirkwood e Sterne, 2006).

As quimiocinas foram descritas segundo grupos e locais de avaliação com uso de medidas resumo e comparadas entre os grupos e locais, uso do teste ANOVA com medidas repetidas, sendo o fator local hierárquico ao fator grupo (Singer e Andrade, 2000). As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Tukey (Neter, et. al., 1996) para verificar entre quais grupos e locais ocorreram as diferenças. Todos os resultados foram padronizados pelo valor do grupo controle, sendo este considerado como 1 e os demais como uma comparação com relação a este valor.

Os resultados das quimiocinas foram descritos no endométrio tópico segundo grupo de pacientes e segundo fase do ciclo menstrual, com uso de medidas resumo e comparados os valores de quimiocinas, segundo grupos e fase com uso de ANOVA com dois fatores (Neter, et. al., 1996).

Os resultados foram ilustrados com gráficos de barras representando as médias com os respectivos erros padrões e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS

Cento e vinte e duas pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico no Setor de endometriose do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sendo que 64 foram incluídas em nosso estudo quando avaliadas, por cumprirem os critérios para participação do mesmo. A seguir, foram divididas nos seguintes grupos: A: 22 pacientes com endometriose intestinal, B: 10 pacientes com endometriose retrocervical e C: 32 pacientes submetidas a laqueadura tubária para contracepção definitiva. A média etária no grupo A foi de 34,14 (DP=4,87), no grupo B de 34,70 (DP=5,66) e no grupo C de 31,97 (DP=3,46), o que não mostrou diferença significativa (p = 0,102) na comparação entre os grupos.

Como exposto na tabela 3, todas as queixas clínicas avaliadas apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos (p<0,001), sendo o valor no grupo controle estatisticamente menor que nos grupos de pacientes.

**Tabela 3 –** Descrição das características referentes ao quadro clínico das pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e mulheres sem endometriose (grupo controle).

	Grupo	% de pacientes acometidas	Média (EVA)	DP	N	р
	Controle	37,50%	1,38	2	32	
	EDT RS	86,36%	7,55	3,26	22	<0,001
Dismenorréia	EDT RC	80%	6,9	3,93	10	
	Controle	0	0	0	32	
	EDT RS	54,54%	3,5	3,67	22	<0,001
Dispareunia	EDT RC	60%	2,3	2,75	10	
	Controle	0	0	0	32	
	EDT RS	36,36%	2,59	3,57	22	<0,001
DPC	EDT RC	50%	2,2	3,19	10	
Alterações	Controle	0	0	0	32	
intestinais	EDT RS	40,90%	2,82	3,71	22	<0,001
cíclicas	EDT RC	40%	2,1	3,45	10	
Alterações	Controle	0	0	0	32	
urinárias	EDT RS	18,18%	1,36	3,06	22	<0,001
cíclicas	EDT RC	0	0	0	10	

DP = desvio padrão

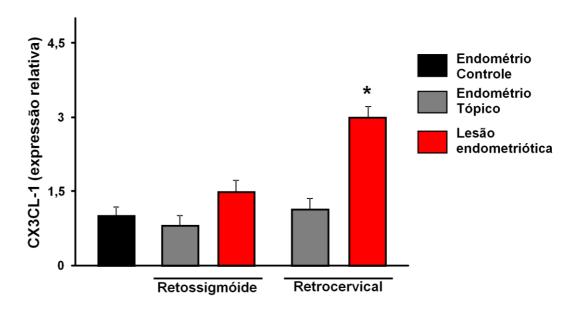
EVA = escala visual analógica de dor

EDT RS = pacientes com endometriose de retossigmóide

EDT RC = pacientes com endometriose retrocervical

Conforme demonstrado pelos gráficos 1 a 4, as quimiocinas CX3CL1, CXCL12 e CCL17 apresentaram médias estatisticamente diferentes entre os grupos ou locais de avaliação (p<0,05). Quando as quimiocinas com diferenças estatísticas significativas foram avaliadas isoladamente, pudemos observar que duas delas (CX3CL1 e CXCL12) eram reguladoras da atividade das células NK.

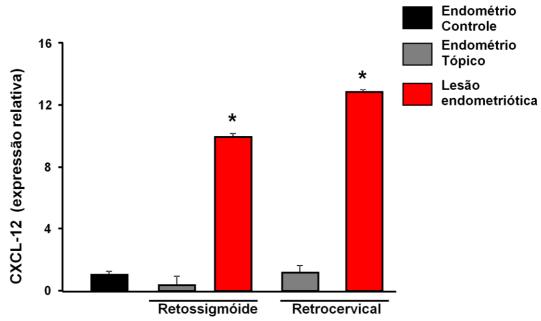
Considerando as quimiocinas relacionadas à atividade das células NK, a CX3CL1 (*Fraktalkine*) apresentou maior expressão na lesão endometriótica da doença retrocervical quando comparado aos demais grupos (p<0,05). (Gráfico1).



\* p<0,05 quando comparado com os demais grupos.

**Gráfico 1** – Expressão relativa da quimiocina CX3CL1 em endométrio tópico e lesão endometriótica de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose.

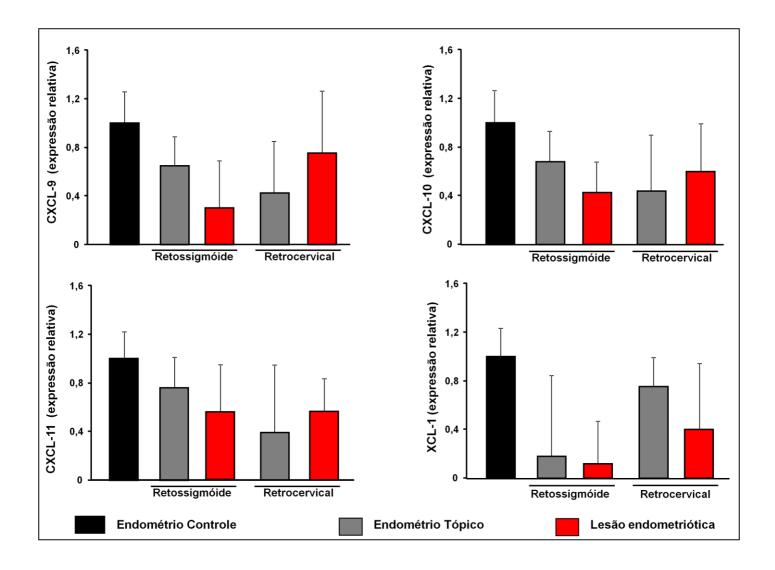
Tanto as pacientes com endometriose retrocervical, como aquelas com doença de retossigmóide, possuíam uma expressão da CXCL12 maior no foco de doença do que no endométrio tópico das mulheres com endometriose e daquelas submetidas à laqueadura tubária (p < 0,05) (Gráfico 2).



\* p<0,05 quando comparado com os demais grupos.

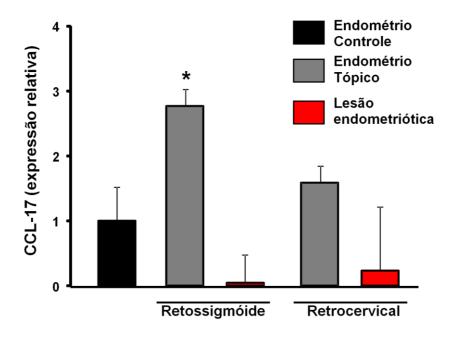
**Gráfico 2**– Expressão relativa da quimiocina CXCL12 em endométrio tópico e lesão endometriótica de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose.

Nas demais quimiocinas relacionadas com a atividade e/ou migração das células NK, não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os grupos e/ou locais avaliados, apesar de verificarmos uma certa tendência em alguns casos, como a XCL1, que parece ser menos expressa na endometriose de retossigmóide e a CXCL9, que parece estar diminuída na lesão endometriótica das pacientes com endometriose de retossigmóide, porém, as duas sem confirmação estatística.



**Quadro 3**– Expressão relativa da quimiocina CXCL9, CXCL10, CXCL11 e XCL1 em endométrio tópico e lesão endometriótica de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose.

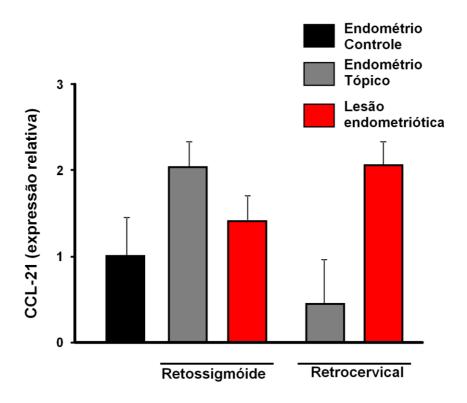
Das quimiocinas relacionadas à atividade das células T-reg, a CCL17 apresentou resultado significativo. Ela foi mais expressa no endométrio tópico de pacientes com lesão em retossigmóide quando comparada aos demais grupos (p<0,05) (Gráfico 3).



<sup>\*</sup> p<0,05 quando comparado com os demais grupos.

**Gráfico 3**– Expressão relativa da quimiocina CCL17 em endométrio tópico e lesão endometriótica de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e endométrio tópico de pacientes sem endometriose.

Quando avaliamos a CCL21, não encontramos diferenças significativas na expressão gênica entre os grupos (Gráfico 4).



**Gráfico 4**– Expressão relativa da quimiocina CCL21 em endométrio tópico e lesão endometriótica de pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide e tópico de pacientes sem endometriose

Nenhuma das duas fases do ciclo menstrual teve predominância significativa em nenhum dos 3 grupos, não mostrando diferenças significativas nas expressões gênicas das quimiocinas quando comparadas as fases do ciclo menstrual (Tabela 4).

**Tabela 4** – Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com e sem endometriose segundo as fases do ciclo menstrual, folicular e lútea.

				o menstr			
Quimiocina		Folicula	ır		Lútea		р
	Média	DP	N	Média	DP	Ν	
XCL1	1,335	1,487	29	0,998	1,147	35	0,189
CX3CL1	1,087	0,914	29	1,086	1,095	35	0,845
CXCL9	1,066	1,058	29	1,786	4,097	35	0,919
CXCL10	0,973	1,053	29	2,183	6,478	35	0,399
CXCL11	1,009	1,183	29	1,449	1,927	35	0,157
CXCL12	1,669	1,812	29	1,395	1,766	35	0,430
CCL17	2,414	1,919	29	3,374	4,631	35	0,751
CCL21	3,917	9,995	29	6,353	25,919	35	0,147

A tabela 5 mostra que pacientes com endometriose e com dismenorréia apresentam estatisticamente menor valor da quimiocina CXCL11 (NK) no endométrio tópico que pacientes sem dismenorréia (p = 0,019).

**Tabela 5** – Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de dismenorréia.

Dismenorréia								
Quimiocina	1	۷ão		Sim		р		
	Média	DP	N Média	DP	Ν			
XCL1	0,396	0,513	5 0,889	0,875	27	0,220		
CX3CL1	0,498	0,250	5 0,945	0,637	27	0,087		
CXCL9	0,685	0,395	5 0,878	1,134	27	0,880		
CXCL10	1,698	1,520	5 0,665	0,398	27	0,060		
CXCL11	2,273	1,661	5 0,700	0,524	27	0,019		
CXCL12	0,592	0,636	5 1,796	2,353	27	0,511		
CCL17	3,822	2,883	5 3,328	4,590	27	0,511		
CCL21	2,336	2,399	5 2,405	2,920	27	0,725		

A tabela 6 mostra que a presença de dispareunia não influencia estatisticamente nos valores das quimiocinas em pacientes com endometriose (p > 0,05).

**Tabela 6** – Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de dispareunia de profundidade.

Quimiocina		Não			Sim		р
	Média	DP	Ν	Média	DP	Ν	
XCL1	1,012	0,949	14	0,657	0,739	18	0,301
CX3CL1	0,922	0,765	14	0,839	0,485	18	0,561
CXCL9	0,570	0,262	14	1,064	1,359	18	0,722
CXCL10	0,857	1,045	14	0,803	0,461	18	0,398
CXCL11	1,182	1,312	14	0,761	0,534	18	0,639
CXCL12	1,172	1,311	14	1,947	2,707	18	0,808
CCL17	3,826	5,660	14	3,078	3,080	18	0,985
CCL21	2,227	2,598	14	2,524	3,031	18	>0,999

Pela tabela 7, tem-se que pacientes com endometriose que possuem dor pélvica crônica apresentam estatisticamente menores valores de CCL17 e de CCL21 (T-reg) (p = 0.001 e p = 0.005 respectivamente) e apresentam

maiores valores de XCL1 e CXCL12 (NK) (p = 0.045 e p = 0.049 respectivamente).

**Tabela 7** – Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de dor pélvica crônica.

Dor Pélvica Cronica								
Quimiocina		Não			Sim		р	
	Média	DP	Ν	Média	DP	Ν		
XCL1	0,593	0,795	19	1,133	0,833	13	0,045	
CX3CL1	0,900	0,699	19	0,838	0,485	13	0,734	
CXCL9	0,986	1,326	19	0,647	0,369	13	0,970	
CXCL10	0,888	0,940	19	0,738	0,383	13	0,880	
CXCL11	1,139	1,155	19	0,663	0,488	13	0,209	
CXCL12	1,005	1,423	19	2,489	2,861	13	0,049	
CCL17	4,776	5,229	19	1,402	0,416	13	0,001	
CCL21	3,369	3,273	19	0,969	0,786	13	0,005	

A tabela 8 mostra que a presença de alterações intestinais não influencia estatisticamente nos valores das quimiocinas estudadas em pacientes com endometriose (p > 0.05).

**Tabela 8** – Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo a presença de alterações intestinais.

Alterações intestinais cíclicas									
Quimiocina		Não			Sim		р		
	Média	DP	Ν	Média	DP	Ν			
XCL1	0,703	0,765	19	0,972	0,952	13	0,650		
CX3CL1	0,845	0,557	19	0,918	0,709	13	0,970		
CXCL9	1,031	1,309	19	0,581	0,385	13	0,223		
CXCL10	0,896	0,901	19	0,725	0,501	13	0,650		
CXCL11	0,994	1,127	19	0,874	0,685	13	0,970		
CXCL12	1,557	2,096	19	1,683	2,457	13	0,910		
CCL17	4,330	5,431	19	2,055	0,966	13	0,448		
CCL21	2,792	3,353	19	1,813	1,705	13	0,762		

A tabela 9 mostra que pacientes com estadiamento avançado (ASRM, 1996) apresentam estatisticamente maior expressão de CCL21 (T-reg) quando comparas às pacientes com estadiamento inicial (p = 0,041).

**Tabela 9** – Descrição da expressão gênica das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas pacientes com endometriose de retossigmóide e retrocervical segundo estadiamento inicial (1 e 2) e avançado (3 e 4) – ASRM 1996.

	Estadiamento						
Quimiocina	Inicia	al (1 e 2)	)	Avanç	ado (3 e	4)	р
	Média	DP	Ν	Média	DP	Ν	
XCL1	1,107	0,435	3	0,782	0,872	29	0,286
CX3CL1	0,429	0,092	3	0,921	0,626	29	0,082
CXCL9	0,405	0,225	3	0,894	1,093	29	0,207
CXCL10	0,528	0,450	3	0,858	0,783	29	0,457
CXCL11	1,512	1,563	3	0,887	0,900	29	0,580
CXCL12	0,728	0,668	3	1,699	2,300	29	>0,999
CCL17	1,638	0,714	3	3,589	4,515	29	0,457
CCL21	0,377	0,136	3	2,603	2,873	29	0,041

5. DISCUSSÃO

A tentativa de identificação da etiopatogenia da endometriose é um dos assuntos mais estudados nos últimos anos (Ulukus et al., 2009). Apesar de novas hipóteses terem sido levantadas, diversas pesquisas têm encontrado evidências de que a teoria da menstruação retrógrada complementada por fatores imunológicos parece ter importante papel na gênese desta doença (Podgaec et al., 2010; Herington et al., 2011; Fassbender et al., 2011).

Levando em consideração as diversas alterações no sistema imunológico observadas até o momento e, considerando que as células T-reg e NK desempenhem importante papel nesta resposta imunológica (Podgaec, et al., 2012 e Dias Jr, et al., 2012), resolvemos estudar o que poderia modificar o comportamento destes dois importantes agentes do sistema imune, as quimiocinas.

As quimiocinas são um grupo de, pelo menos, 47 proteínas correlatas, fazendo delas a maior família de citocinas conhecida (Robertson et al., 2002; Abbas et al., 2011) e são divididas em quatro subgrupos: CXC (ou a), CC (ou b), CX<sub>3</sub>C e subfamílias C. Cada quimiocina consegue se ligar a mais de um receptor e cada receptor interage com mais de uma quimiocina (Nishida et al., 2011).

Conforme a própria nomenclatura, quimiocinas são citocinas quimiotáticas. Elas atuam se ligando a receptores de membrana e podem, desta forma, modular a atividade de algumas células mediadoras da resposta inflamatória, incluindo-se as células T-reg e NK. A migração e a atividade dessas células nos tecidos-alvo podem ser influenciadas pela ação deste grupo de proteínas (Qin et al., 2008).

A correlação entre a atividade das células T-reg e células NK na endometriose ainda é assunto pouco esclarecido. Se considerarmos ainda que suas ações podem ser moduladas por outros mediadores da resposta inflamatória como as quimiocinas, abrimos um leque ainda maior de perguntas.

Budiu et al (2009) avaliaram a presença da glicoproteína mucina 1, (MUC1) na endometriose. Estas são normalmente expressas no epitélio luminar e glandular em endométrio humano e pouco expressas nas células epiteliais do ovário. No entanto, são superexpressadas em carcinomas ovarianos de células claras e endometrióides. Além disto, alguns estudos visando uma terapia antígeno-específica contra 0 câncer desenvolvidos avaliando uma possível vacina contra a MUC1 (Cramer, et al., 2005 e Oei, et al., 2008) e, desta forma, os autores deste grupo resolveram avaliar o comportamento desta glicoproteína em um modelo animal de endometriose ovariana, além de avaliarem sua resposta inflamatória. Encontraram um aumento da expressão de MUC1 na superfície ovariana e uma predominância da subclasse IgG1, sugerindo uma resposta Th2 e um acúmulo de linfócitos Foxp3+ CD4 nos linfonodos nos estágios avançados de doença.

Basta et al (2010) avaliaram 47 mulheres, sendo 16 submetidas à laparoscopia para tratamento de gestação ectópica tubárea, 16 mulheres submetidas à laparoscopia para tratamento de endometrioma ovariano e 15 pacientes submetidas à laqueadura tubárea que foram denominadas grupo controle. Neste estudo, o percentual de Foxp3+ com a subpopulação de linfócitos T CD4+CD25high encontrados na decídua do grupo com gestação ectópica foi significativamente menor quando comparados tanto aos tecidos das pacientes com endometriomas ovarianos quanto ao endométrio do grupo controle. Os autores especularam que os distúrbios do equilíbrio do endometrioma e da decídua na gestação ectópica seriam devidos a alterações da população de células T-reg nestes locais.

Berbic et al., em 2010, realizaram um estudo em que analisaram por imunoistoquimica a expressão de Foxp3 em amostras de 127 endométrios tópicos e 59 lesões endometrióticas peritoneais. Foi demonstrado que nas pacientes com endometriose, a expressão de células Foxp3+ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> não tiveram o declínio esperado na fase secretora do ciclo menstrual. Isto poderia contribuir para a diminuição na habilidade de recrutar novos leucócitos ou outras células do sistema imune para permitir uma resposta

imunológica efetiva contra os fragmentos endometriais que adentram à cavidade peritoneal, impedindo ou, ao menos, dificultando o desenvolvimento dos implantes endometrióticos.

André et al., 2011, mostraram a presença de certos polimorfismos no Foxp3 em pacientes inférteis e com endometriose quando comparadas a mulheres normais. Utilizaram uma coorte de 419 mulheres, sendo 177 mulheres inférteis e com endometriose, 71 mulheres com infertilidade idiopática e 171 mulheres férteis como controle. Avaliaram amostras de sangue periférico e os polimorfismos foram identificados por meio do uso de PCR. Após análise estatística, encontraram que o polimosfismo rs3761549 estava fortemente associado à endometriose. Foi o primeiro estudo avaliando polimorfismos do Foxp3 com a endometriose e infertilidade, sugerindo uma relação entre os mesmos.

Qin et al., 2008 mostraram que as células T-reg sofrem influência de algumas quimiocinas (CCL17 e 21) podendo fazer com que o desempenho de sua função seja exacerbado ou mesmo comprometido, através da inibição de sua ação. Em nosso trabalho pudemos observar uma diferença estatística significativa na avaliação da quimiocina CCL17, que foi mais expressa no endométrio tópico das pacientes com endometriose de retossigmóide.

Sabemos que a quimiocina CCL17 pode modular a ação das células T-reg (Qin et al., 2008, Heiseke et al., 2012). Muitos estudos já demonstraram a ação desta quimiocina na gênese de doenças intestinais, como a doença de Crohn (Izcue et al., 2008; Park et al., 2010; Heiseke et al., 2012). Experimentos usando camundongos deficientes em CCL17 confirmaram que esses animais não são capazes de desenvolver sinais clínicos relevantes de doenças autoimunes intestinais, mesmo quando avaliados em diferentes espaços de tempo. Estes resultados sugerem que a inflamação é colocada em xeque e pode ser inibida por fatores imunes regulados em camundongos deficientes em CCL17, já que esta quimiocina parece ser essencial para o desenvolvimento da inflamação no intestino de camundongos. A CCL17 tem um efeito autócrino nas células dendríticas que promove a produção de citocinas inflamatórias e a ativação das respostas

Th1 e Th17, que reduzem a expansão de células T-reg. Desta forma, Heiseke et al., em 2012, demonstraram que os camundongos deficientes em CCL17 têm maior propensão à expansão clonal de células T-reg em comparação aos camundongos competentes em CCL17. Ou seja, a falta de CCL17 permite que as células T-reg tenham uma expansão de seu número e, desta forma, uma maior ação na manutenção da resposta imune.

Sendo assim, a sua concentração diminuída na lesão endometriótica de pacientes com endometriose de retossigmóide quando comparado ao endométrio tópico de pacientes controles, nos leva a pensar em uma possível associação com a gênese de outras doenças autoimunes intestinais. Esta diminuição de CCL17 encontrada na lesão de retossigmóide, permitiria a expansão clonal de células T-reg neste local. Isto ainda vai ao encontro do que já foi relatado por outros autores (Budiu et al., 2009; Berbic et al., 2010; Basta et al., 2010; Prieto, 2011) e mesmo com o relatado por nosso grupo em 2012, quando Podgaec, et al., demonstraram um percentual maior de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> no fluído peritoneal de mulheres com endometriose. O aumento da concentração das células T-reg no fluído peritoneal de pacientes com endometriose e ainda, a sua maior concentração nos endometriomas ovarianos nos leva a uma hipótese de que esta maior concentração leve a um funcionamento defeituoso das outras células do sistema imune. Sendo assim, o encontrado em nosso estudo complementaria a descrição de um ambiente propenso à maior concentração destas células que atuam de forma tão intensa na resposta imune. Além disto, a maior concentração de CCL17 no endométrio tópico das pacientes com endometriose intestinal indica a baixa propensão das células T-reg em se concentrar nesta localização, permitindo um maior acúmulo na cavidade peritoneal e ocasionando algumas das modificações da resposta imune que poderiam ser parte da resposta para a instalação desta doença.

As células NK, assim como outras células T e B, são um dos maiores subconjuntos de linfócitos que foram identificados em todas as espécies de vertebrados examinados (Linsen et al., 2005). São linfócitos distintos das células T e B e que desempenham importante papel nas respostas imunes

inata e adaptativa. O termo *natural killer* deriva do fato de que estas células são capazes de realizar sua função de morte sem a necessidade de expansão clonal e/ou diferenciação, fato necessário por outras células assassinas do sistema imune, como os linfócitos T citotóxicos (CTL) (Robertson, 2002).

Como as células NK participam do *clearance* das células endometriais regurgitadas para a cavidade abdominal, imagina-se que elas estejam subativadas na endometriose ou não reconheçam o tecido endometrial ectópico como sendo um material em apoptose e que deveria ser eliminado (Ota et al., 2002). Entretanto, o número de células NK é um tema um tanto quanto controverso. Diversos trabalhos são conflitantes, mostrando que este número pode estar diminuído (Ota et al., 2002), aumentado (Hill et al., 1988 e Masubayashi et al., 2001), inalterado (Oosterlynck et al., 1994) ou variável de acordo com o estádio (ASRM, 1986) da doença (Dias Jr et al., 2005).

A atividade das células NK pode ser modulada pela presença de algumas quimiocinas (Robertson, 2002). Seja pelo aumento da migração destas células em resposta à presença de determinadas quimiocinas (CXCL 9, 10, 11 e 12, XCL1 e CX3CL1), como pelo aumento de sua atividade citolítica quando na presença de quimiocinas específicas (CXCL10 e CX3CL1) (Robertson, 2002; Moris and Ley, 2004; Groom and Luster, 2011).

A presença diferenciada de algumas quimiocinas encontradas em nosso trabalho, como a CX3CL1 e a CXCL12, mostra exatamente esta ação deficitária de células NK em pacientes com endometriose. Apesar de não termos resultados estatisticamente significativos, as quimiocinas XCL1, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 foram mais expressas no grupo controle que em pacientes com endometriose. Principalmente se levarmos em consideração a XCL1 e a CXCL9 que tiveram resultados aparentemente mais expressivos e, como elas atuam de modo a estimular a migração das células NK, isto iria ao encontro do acima exposto, sugerindo uma migração deficitária de células NK para sítios de endometriose, permitindo, desta forma um comprometimento da resposta imune local e o posterior desenvolvimento da doença.

A CX3CL1 (*Fraktalkine*) é uma das quimiocinas mais estudadas em endometriose (Zhang et al., 2004; Shimoya et al., 2005; Watanabe et al., 2006; Nishida et al., 2011). Watanabe et al., 2006 avaliando mulheres sem endometriose, demonstraram que a CX3CL1 é mais presente no endométrio tópico na fase secretora, quando comparada à proliferativa, exemplificando ainda que a presença dela poderia ser uma das responsáveis pela regulação do ambiente imunológico, atraindo células NK.

Nosso estudo encontrou uma diferença estatística significativa no que diz respeito à presença de CX3CL1 no endométrio ectópico de pacientes com endometriose retrocervical. Quando comparadas ao endométrio tópico das pacientes dos demais grupos, apresentavam uma expressão aumentada. Isto talvez mostre uma tentativa do organismo em aumentar a quimiotaxia para células de defesa, como as NK e, desta forma tentar diminuir os danos causados por esta doença.

CXCL12 (SDF-1a - Stromal cell-derived factor-1) foi identificado com um produto de gene que é regulado de uma maneira consistente pelo estrogênio, além de também estar relacionada com a migração de células NK (Glace et al., 2009). Neste grupo encontramos uma concentração menor no endométrio tópico de pacientes e controles, quando comparado às lesões das pacientes com endometriose. Também nos estranha o fato da sua concentração ser maior na lesão de endometriose, mas usando da mesma hipótese levantada para a CX3CL1, acreditamos ser uma resposta do organismo, na tentativa de tentar aumentar a concentração de células de defesa contra a endometriose.

Utilizando um modelo animal com camundongos, Glace et al., em 2009, também demonstraram um aumento na expressão de CXCL12 nas lesões em casos de endometriose ovariana em comparação ao endométrio tópico, mostrando ainda que este aumento pode ser reprimido pelo raloxifeno e pela progesterona. Da mesma maneira, Furuya et al., em 2007, mostrou diferenças no comportamento das quimiocinas CXC em pacientes com endometriose ovariana e com carcinomas ovarianos, quando comparados a pacientes livres de doença. Encontraram também um aumento da expressão

de CXCL12 nas lesões ovarianas quando comparados aos endométrios tópicos (Furuya et a., 2007).

Em 2009, Al-Jefout et al., publicaram interessante estudo duplo cego que trouxe novas perspectivas para o diagnóstico não invasivo da endometriose. Neste estudo, os autores utilizaram a detecção de fibras nervosas no endométrio de pacientes com endometriose, através da biópsia endometrial e imunoistoquímica. Os resultados mostraram que, em 64 mulheres com diagnóstico laparoscópico de endometriose, a média de densidade de fibras nervosas na biópsia endometrial foi de 2,7 fibras nervosas milímetro quadrado. **Apenas** uma mulher por com endometriose não teve fibras nervosas detectáveis. Seis mulheres tiveram fibras nervosas detectadas, mas não tinham endometriose ativa vista na laparoscopia. Com altas sensibilidade e especificidade, a densidade das fibras nervosas não variou nas diferentes fases do ciclo menstrual. Além disto, as mulheres com endometriose e sintomas de dor têm maior densidade de fibras nervosas em comparação com mulheres inférteis, mas sem dor.

Utilizando esta mesma prerrogativa de um diagnóstico não invasivo para endometriose e, também pensando na biópsia endometrial como alternativa, avaliamos a expressão das quimiocinas estudadas de acordo com os sintomas apresentados. Desta forma, pudemos observar diferenças estatísticas significativas quando avaliamos a dismenorréia e a dor pélvica crônica. No primeiro caso, tivemos uma maior expressão de CXCL11 no endométrio tópico das mulheres que não apresentavam dismenorréia. No caso da dor pélvica crônica, tivemos uma maior expressão de CXCL12 no endométrio tópico das mulheres que apresentavam a queixa e uma maior expressão de CCL17 e CCL21 naquelas que não apresentavam a queixa clínica.

Quando avaliamos alterações intestinais cíclicas e dispareunia, não encontramos diferenças significativas. As alterações urinárias cíclicas não foram avaliadas pois eram pacientes sem endometriose do trato urinário e também não avaliamos o aspecto infertilidade visto que em nosso grupo controle, todas as pacientes eram multíparas.

Não foi encontrado nenhum estudo na literatura para que pudéssemos discutir sobre o fato de termos encontrado uma maior expressão de CCL21 no endométrio tópico de pacientes com estádios avançados da doença.

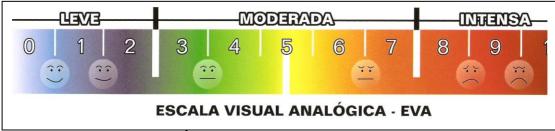
A endometriose é uma entidade em estudo e que muitas dúvidas ainda pairam no ar. A teoria imunológica é alvo de muitas pesquisas atualmente. Diversos estudos têm tratado a endometriose como uma doença imunológica (Agic et al., 2006; Podgaec et al., 2007; Barrier, 2010) e, provavelmente, a busca por um diagnóstico não invasivo e mesmo por um tratamento ou profilaxia definitivos poderão vir desta teoria.

A ação de células mediadoras da resposta inflamatória como as células T-reg e NK, parece ter papel fundamental na gênese desta doença. Além disto, como visto pela primeira vez em nosso estudo, o papel de algumas quimiocinas, como a CCL17, CX3CL1 e CXCL12, na modulação desta resposta inflamatória fará parte do quebra-cabeças para a resposta inflamatória da endometriose.

6. CONCLUSÕES

- Com relação às quimiocinas relacionadas à atividade das células NK, as pacientes com endometriose profunda apresentam:
  - expressão de CX3CL1 e CXCL12 aumentadas de forma significativa no foco de endometriose, quando comparadas ao endométrio tópico das pacientes com e sem endometriose.
  - as quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11 e XCL1 n\u00e3o tiveram diferen\u00e7as estat\u00edsticas significativas nos grupos estudados.
- 2. Com relação às quimiocinas relacionadas à atividade das células Treg, as pacientes com endometriose profunda apresentam:
  - expressão de CCL17 aumentada no endométrio tópico das pacientes com endometriose de retossigmóide em comparação ao endométrio tópico das pacientes com endometriose retrocervical e sem endometriose e, quando comparada ao foco de endometriose nas pacientes com endometriose retrocervical e de retossigmóide.
  - a expressão da quimiocinas CCL21 não apresentou diferenças estatísticas significativas nos grupos estudados.
- 3. Com relação à fase do ciclo menstrual, não se observou diferenças significativas na expressão das quimiocinas.
- 4. Em relação ao quadro clínico, encontramos que as pacientes com dismenorréia e endometriose apresentam menor valor de CXCL11 no endométrio tópico. Aquelas com dor pélvica crônica apresentam valores menores de CCL17 e CCL21 e maiores de XCL1 e CXCL12 no endométrio tópico. Os demais sintomas não tem correlação com a expressão das quimiocinas.
- 5. Pacientes com estadiamento avançado (ASRM, 1996) da doença apresentam maior valor de CCL21 no endométrio tópico.

#### Anexo 1



## ESCALA VISUAL ANALÓGICA – EVA

A Escala Visual Analógica – EVA auxilia 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 analisarmos 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 EVA pode ser utilizada no início e no final de cada atendimento, registrando o resultado sempre na evolução. Para utilizar a EVA 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 sugestionar o paciente.

## Anexo 2 - Aprovação Comitê de Ética e Pesquisa - HCFMUSP



# **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28/04/2010, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 0025/10, intitulado: "A EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS REGULATÓRIAS DAS CÉLULAS NATURAL KILLER E T-REGULADORAS EM PACIENTES COM ENDOMETRIOSE" apresentado pelo Departamento de OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Sergio Podgaec

Pesquisador (a) Executante: Patrick Bellelis

CAPPesa, 29 de Abril de 2010

8-1

Prof. Dr. Eduardo Massad Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5° andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: . cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

# Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido (pacientes)

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICA	ÇÃO DO SUJE	EITO DA PESQUISA	OU RESPONSÁVEL	LEGAL
1. NOME:  DOCUMENTO DE IDENTIDADE DATA NASCIMENTO:/	Ξ Nº : /	SEX	D: .M	
ENDEREÇO BAIRRO: CEP:	TELEFONE: DI	CIDADE DD ()	Ar I	
2.RESPONSÁVEL LEGAL	o, tutor, curador ≣ : ./	etc.)SEXO: M 🗆	Fo	
BAIRRO:				CIDADE:
CEP:			TELEFONE:	DDD
	DADOS S	OBRE A PESQUISA		
TÍTULO DO PROTOCOLO DE Killer e T-reguladoras em pacient PESQUISADOR : SÉRGIO POL	es com endome	triose		
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO AS	SISTENTE INS	CRIÇÃO CONSELHO	O REGIONAL Nº 726	44
UNIDADE DO HCFMUSP: DEP	ARTAMENTO [	DE GINECOLOGIA		
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PI	ESQUISA:			
		RISCO MÉDIO	x	
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR		

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

- 1 Para o tratamento da sua doença, a senhora terá que ser submetida a uma cirurgia. O objetivo deste estudo é avaliar se a coleta de sangue de seu braço e de líquido que existe em seu abdome no início da cirurgia, além da análise do material retirado durante a cirurgia podem ajudar no diagnóstico e tratamento da sua doença que se chama endometriose.
- 2 Conforme comentado acima, a senhora será submetida à cirurgia e também a coleta de sangue do braço e de líquido do abdome durante esta cirurgia. Além disto, o material retirado durante a cirurgia será encaminhado para análise.
- 3 Serão realizados: coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos: antes da anestesia, será realizada punção em seu braço para a coleta de sangue. Durante a cirurgia, o líquido encontrado dentro de seu abdome e os focos de endometriose serão coletados e encaminhados para análise.
- 4 Durante a cirurgia podem ocorrer complicações, já que a senhora estará anestesiada, mas, conforme comentado, sua doença exige esta cirurgia. Todo o procedimento da pesquisa será realizado enquanto a senhora estiver anestesiada. Os desconfortos podem ocorrer depois, como: dor no local da cirurgia, fraqueza, vômito (pela anestesia), infecção do corte e hematoma (mancha roxa na pele).
- 5 Não há benefícios diretos ao participante, porém, com esta pesquisa da qual a senhora está participando, tentamos descobrir se com os exames de sangue e do líquido de seu abdome poderíamos evitar as cirurgias nos casos de endometriose.
- 6 Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não há
- 7 Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Patrick Bellelis que pode ser encontrado no endereço Av Dr Enéas Carvalho de Aguiar, 255 10° andar.Telefone(s) 3069-6373. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5° andar tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
- 8 É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 09 As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 12 Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos

neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "A expressão de quimiocinas regulatórias das células Natural Killer e Treguladoras em pacientes com endometriose"

Eu discuti com o Dr. Sergio Podgaec sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.
Assinatura do paciente/representante legal Data/ _/
Assinatura da testemunha Data/_/
para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.
(Somente para o responsável do projeto)
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.
Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

# Anexo 4 – Termo de consentimento livre e esclarecido (controles)

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICA	AÇÃO DO SUJE	ITO DA PESQUISA	OU RESPONSÁV	EL LEGAL
1. NOME: ::	E Nº :	SEX Nº CIDADE	O: .M	APTO:
2.RESPONSÁVEL LEGAL NATUREZA (grau de parentesc DOCUMENTO DE IDENTIDADI DATA NASCIMENTO:/ ENDEREÇO:	o, tutor, curador E :	etc.)SEXO: M :	F 🗆	
BAIRRO:				CIDADE:
CEP:			TELEFONE:	DDD
	DADOS SO	BRE A PESQUISA		
1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE Killer e T-reguladoras em pacient			ocinas regulatórias	das células Natural
PESQUISADOR : SÉRGIO POI	OGAEC			
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO AS	SSISTENTE INS	CRIÇÃO CONSELH	O REGIONAL Nº 7	72644
UNIDADE DO HCFMUSP: DEP	ARTAMENTO D	E GINECOLOGIA		
CITIES TO LICE MOOF . DET				
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA P	ESQUISA:			
	ESQUISA:	RISCO MÉDIO	×	

**4**.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

- 1 Para o tratamento da sua doença, a senhora terá que ser submetida a uma cirurgia. O objetivo deste estudo é avaliar se a coleta de sangue de seu braço e de líquido que existe em seu abdome no início da cirurgia, além da análise do material retirado durante a cirurgia, quando comparados a pacientes com endometriose, podem ajudar no diagnóstico e tratamento da sua doença que se chama endometriose.
- 2 Conforme comentado acima, a senhora será submetida à cirurgia e também a coleta de sangue do braço e de líquido do abdome durante esta cirurgia. Além disto, o material retirado durante a cirurgia será encaminhado para análise.
- 3 Serão realizados: coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos: antes da anestesia, será realizada punção em seu braço para a coleta de sangue. Durante a cirurgia, o líquido encontrado dentro de seu abdome e os focos de endometriose serão coletados e encaminhados para análise.
- 4 Durante a cirurgia podem ocorrer complicações, já que a senhora estará anestesiada, mas, conforme comentado, sua doença exige esta cirurgia. Todo o procedimento da pesquisa será realizado enquanto a senhora estiver anestesiada. Os desconfortos podem ocorrer depois, como: dor no local da cirurgia, fraqueza, vômito (pela anestesia), infecção do corte e hematoma (mancha roxa na pele).
- 5 Não há benefícios diretos ao participante, porém, com esta pesquisa da qual a senhora está participando, tentamos descobrir se com os exames de sangue e do líquido de seu abdome poderíamos evitar as cirurgias nos casos de endometriose.
- 6 Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não há
- 7 Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Patrick Bellelis que pode ser encontrado no endereço Av Dr Enéas Carvalho de Aguiar, 255 10° andar.Telefone(s) 3069-6373. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5° andar tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramail 26 E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
- 8 É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 09 As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

- 12 Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
- 13 Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "A expressão de quimiocinas regulatórias das células Natural Killer e T-reguladoras em pacientes com endometriose"

Eu discuti com o Dr. Sergio Podgaec sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuizo ou perda de qualquer
benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.
Assinatura do paciente/representante legal Data//
Assinatura da testemunha Data / /
7 Sindada da testerrarria
para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de
deficiência auditiva ou visual.
(Somente para o responsável do projeto)
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste pacient
ou representante legal para a participação neste estudo.
ou representante regul para a participação resolución
Assinatura do responsável pelo estudo Data/_/

Anexo 5 – Expressão das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 do endométrio tópico das pacientes submetidas à laqueadura tubária.

Iniciais	XCL1	CX3CL1	CXCL9	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL17	CCL21
VDR	0,643361	0,921856149	0,197470211	0,599773761	0,298133084	3,910586949	0,00128226	0,189582597
MHS	0,335341	1,225706489	2,301711376	0,659063926	0,717986383	0,181543246	2,211315689	11,95795215
MEGC	0,971778	1,846269999	1,386749243	0,591106632	0,90627977	1,223814724	0,009936166	1,287790969
AS	1,837443	4,716162891	1,699024831	0,538676231	1,112672014	1,132401183	6,671009057	1,878913222
MAJF	0,489948	2,833555673	0,584675052	0,6006058	1,09052919	2,456127001	2,102207385	0,55783039
CAAS	0,486901	0,535743204	0,722318456	38,78670489	10,35336895	0,441469343	0,513310971	0,182364705
MLO	0,39576	0,57618881	0,364428309	0,439974042	1,022448649	0,200320943	1,08065424	0,135644122
VMS	0,442485	0,59526895	0,379114867	5,196320126	0,931113141	1,737948294	1,374498183	0,183124717
CSA	0,531706	1,230814674	3,783461954	0,271399565	1,615553343	0,261047665	3,221884999	54,2630576
<b>PGOS</b>	0,225891	0,513919232	0,266592285	1,058110511	0,229573558	0,506763724	1,384058574	0,442239084
COJ	1,418828	1,145211092	0,745203801	2,792370378	0,497589652	3,578574864	3,084218551	0,044283051
NMAB	5,932743	6,47829223	11,29574044	0,186272979	1,680660574	1,791769631	13,70760861	154,4395491
SMS	1,051683	0,858335485	0,318796333	1,309022879	0,368319169	1,112176039	1,413140587	0,121995382
MJSL	1,321979	2,16237022	1,355388971	1,172420673	0,806098692	5,312478735	0,010130892	6,82532828
SRS	0,777384	1,48618483	0,749867155	0,768698795	1,039599891	0,592293912	7,594236878	0,944025959
SMK	0,260021	1,149186977	0,268818985	1,120770053	0,638619445	0,937821436	1,084405999	2,373306514
SDF	0,526206	1,409920238	0,459681636	0,874475768	0,638176941	0,855230471	6,385966568	0,725425034
MLS	7,157617	0,483696347	1,080336641	0,584996668	0,381813068	1,419630191	2,296337985	0,666182073
LLS	0,438822	0,98046195	1,178716638	6,261031296	5,600743613	0,45387759	0,622814743	0,722920265
IASQ	2,716463	1,057321078	3,655495403	1,071535994	1,154284127	2,758062522	6,08874545	1,978940776
CMS	0,412424	0,293020509	0,537311618	0,812652408	1,109037684	1,789808409	0,722107234	0,553071704
SRS	1,8757	1,173919555	1,189791633	0,54242302	0,544139471	1,326059179	2,366614954	1,494163927
VAF	1,343726	0,547649041	1,713386869	0,303561411	1,346914606	0,175764444	0,031207465	0,033773335
EMD	1,495667	0,885806537	0,726452784	0,577198843	0,766627889	0,392802267	2,598654797	6,162895966

SDM	0,560326	0,933397526	1,28136451	2,353797669	4,342989266	0,830311832	1,849909892	3,482826094
EMS	1	1	22,4589245	1,29635452	0,897807708	1	0,608257876	0,658268669
EUR	2,779893	0,382261961	0,799130453	0,552019185	0,710934419	1,776016717	1,678142235	0,526176396
JUJ	1,427588	0,540697484	0,85341001	0,767543442	1	1,502052419	2,545192896	1,033277985
LOM	1,833715	1,054700623	1,521085172	0,858315712	1,010660456	3,561179513	1,44086483	2,149481119
MLB	1,477706	0,731993909	0,456714006	0,681157493	0,475810293	0,775777673	1,34089382	0,630220434
PZF	1,206167	0,657195063	0,918763175	1,104972383	0,9881544	0,491187299	2,075264176	0,540654344
LHJM	4,31102	1,136370707	1,014623821	3,41165157	5,45216184	1,292035009	1,005612857	2,170516572

Anexo 6 – Expressão das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas lesões de endometriose das pacientes com endometriose de retossigmóide.

1.7.7.7.	VOI 4	0\/001.4	01/01/0	0\/0 .40	0)/01.44	0\/0 .40	0\/0 .47	001.04
Iniciais	XCL1	CX3CL1	CXCL9	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL17	CCL21
GHM	0,461275111	0,752421797	0,284737998	1,91386665	0,266097781	6,535896607	0,001586326	4,819549963
FFB	0,185269764	2,487356934	0,034284658	0,099890432	0,180995833	12,12897021	0,00816068	1,776328538
MEGC	0,097645634	0,194469195	0,095305741	0,354164205	0,092527652	9,430832708	0,340070319	0,486630428
ASS	0,152904138	2,522079143	0,052874171	0,177327761	0,138795085	11,48266143	0,530308949	1,553905142
MDM	0,016777823	0,961003472	0,328441182	0,829601445	3,931359749	4,294187427	0,030520132	0,608740154
MFD	0,014414847	2,093059825	0,027369387	0,082898529	0,126835314	23,67652031	0,042715545	1,104886701
ACC	0,345725604	0,3873242	0,094581835	0,571763453	0,163688899	3,571141159	0,032015292	0,61000731
MLB	1	0,843589795	0,039437364	0,29351178	0,301457888	8,860481874	0,112726999	0,699258813
MFD	0,183735124	1,164421634	0,124801479	0,297196764	0,369085864	1,717589362	0,027165229	1,308485954
AAS	0,045588993	2,938935197	0,731534057	2,701611663	6,401404113	7,418436515	0,151772783	1,715725124
MFD	0,528043744	1,3995117	1,073749111	0,405768932	0,804072998	9,222099051	0,009024827	2,541162153
DRB	1	3,093764857	0,232389524	0,424671828	0,433786899	33,91696471	0,183043062	1,685572214
SFR	0,472180168	3,294303668	0,505922721	0,536909305	1,490801718	10,05474899	0,005412703	5,059302275
MFE	0,079171739	5,32954935	0,750430795	0,676860444	0,941457835	23,88222192	0,07875662	0,085231967
ASD	0,09040832	3,096596806	0,589973041	0,321892376	1,287032413	35,9556145	0,049797772	2,77821536
PLS	0,036184091	0,425261911	1,550675632	0,23724183	0,047584924	4,971375788	0,014381171	0,707978983
SET	0,017138437	1,251730125	1,319847219	0,422144936	0,992355115	7,860086347	0,079732129	1,835277777
SDF	0,114259764	1,412943276	0,618746746	0,333764013	2,030279551	11,38825787	0,094003938	1,767007836
FF	0,10787402	0,891695813	0,63891811	0,219356644	0,388322818	9,002496673	0,081856171	2,180982868
IA	0,208523134	4,866564069	0,289196688	0,452475102	1,283024204	15,9867543	0,111033352	2,563257538
MS	0,225869183	1,294732042	1,620506646	0,869911362	1,287433922	10,01989275	0,099977343	2,855668349
PBB	0,142977432	2,342426124	0,735869037	0,857923142	1,519628197	13,7314794	0,010655152	1,994667722

Anexo 7 – Expressão das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 no endométrio tópico das pacientes com endometriose de retossigmóide.

Iniciais	XCL1	CX3CL1	CXCL9	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL17	CCL21
GHM	0,01861616	0,257673048	0,406606994	1,009394627	1,097353529	0,055030878	3,149024539	1,845355072
FFB	0,040015406	0,893545778	0,360658902	1,89669843	2,06197721	0,126165132	7,371228086	6,399230519
MEGC	0,022292456	0,341892232	0,32257509	0,464738256	0,505235664	0,028903443	1,172757722	2,44850041
ASS	0,015535359	0,420627054	0,418618199	0,60814629	0,661140311	0,104776361	4,181165066	3,012368862
MDM	0,014758597	0,88246658	0,263286771	0,381959165	0,415243182	0,03630684	2,063230493	6,319885573
MFD	0,044492296	1,631968882	0,668827901	1,182213264	1,285231626	0,088718892	5,486571857	11,68753222
ACC	0,006231086	0,309200284	0,783881204	4,241252315	4,610836111	0,23822309	6,267564769	2,214373277
MLB	0,461275111	1,422682319	0,6393629	0,641486279	0,697385555	0,037822412	22,78330282	10,18870252
MFD	0,036694289	0,479503599	0,425640382	1,050801607	1,142368724	0,086832875	2,707394273	3,43401999
AAS	0,018652843	0,74026491	5,339027343	0,785389553	0,853828596	0,079790741	13,03153387	5,30149201
MFD	0,017712226	0,200140293	3,81482516	0,617037601	0,670806413	0,130327656	5,545528659	1,433327649
DRB	0,046132566	0,589593918	1,259470157	0,079307456	0,086218328	0,015252031	2,29969893	4,222444433
SFR	2,953937609	1,782650089	0,221732006	0,226063552	0,304176033	1,336273353	0,891270339	1,386904489
MFE	2,63914269	0,679777044	0,682115021	0,424177591	0,367327392	1,235414494	1,101649278	0,423486662
ASD	1,41969336	2,34302695	0,552510175	0,460655554	0,704620516	3,860894576	1,794528704	1,581801357
PLS	1,244261184	1,068964208	1,347062638	1,702565513	1,94001578	8,748557515	1,456893077	2,077946395
SET	2,523470734	1,915782192	0,623188682	0,742730286	0,599606691	1,190299941	1,647107823	0,39973573
SDF	2,142268565	1,690644757	0,5769279	0,72107954	0,502441796	1,262816627	1,828049327	0,914565522
FF	1,011509139	1,051955406	0,758889078	0,653083929	0,48771099	7,839682139	2,121059365	1,688437103
IA	1,355109426	2,508410647	0,598794526	1,47553722	2,295484017	2,892456297	1,953139507	1,721956189
MS	0,764829118	0,441539236	0,520377662	0,599765446	1,335785526	0,607924961	1,513433201	0,44876076
PBB	0,76678252	0,572426969	0,39506582	0,299241114	0,414170983	4,846136903	1,392449494	0,401187466

Anexo 8 – Expressão das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 nas lesões de endometriose das pacientes com endometriose retrocervical.

Iniciais	XCL1	CX3CL1	CXCL9	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL17	CCL21
PPD	0,991510087	1,183954426	1,769947953	1,007297831	0,754204878	5,405339228	1,628907861	0,589228222
MFC	0,325944753	4,001701479	0,64113805	0,210587296	0,434680833	23,26977186	0,038926731	2,281366823
MJS	0,079422928	4,508393833	0,239103464	0,312188719	0,313606722	16,92853428	0,174936713	2,371662033
FV	0,367215626	1,504843594	0,433380738	1	0,871775393	8,909751295	0,007779564	2,058935217
CI	0,138763434	5,016264942	0,132742931	0,368181824	0,175924508	17,72096375	0,030946177	1,134375625
CP	0,245334045	2,563639757	0,689985016	2,307867363	1,19413702	14,9504309	0,133220222	1,825306121
CC	0,972061404	3,506625953	1,609861904	0,662269495	0,866323878	12,04619123	0,605851028	2,741049606
ADV	1,901739125	4,619682008	3,75212252	0,917939078	0,575476287	10,90120084	7,121716469	5,150556923
EDT	1,964264697	4,519626483	2,986875155	1,175252144	0,882726483	17,67728933	2,517069409	3,93100565
MGS	0,086662962	1,824515678	0,293492784	0,228701909	0,343596772	10,23000653	0,125930967	1,84543182

Anexo 9 – Expressão das quimiocinas XCL1, CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL17 e CCL21 no endométrio tópico das pacientes com endometriose retrocervical.

Iniciais	XCL1	CX3CL1	CXCL9	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL17	CCL21
PPD	0,825705577	0,564206199	1,2515422	1	1	0,569348995	1,063562636	0,084079531
MFC	0,504420689	0,704943389	1	0,279998366	0,136032982	2,147093713	0,924602392	1,809885509
MJS	0,957071992	0,515101272	1,326575639	0,403737728	0,439223876	1,093827441	1,329519558	1
FV	0,959729241	0,514153398	0,548934887	0,937239922	3,155849459	1,448324785	0,993715656	0,220354526
CI	0,252035586	0,83971078	0,272193956	0,912243147	0,413519821	0,333182645	2,07039351	0,102870301
CP	0,513832253	0,700359589	0,627517213	0,513996454	0,724430095	3,364996866	3,736441669	1,01389513
CC	0,636317787	0,643352895	0,095963324	1,094680845	0,489434731	2,486635696	1	0,957569056
ADV	0,781733818	0,58166733	0,333948361	0,307355523	0,386906907	3,975772377	2,75743141	0,561885641
EDT	1,395468303	0,38012128	0,561273923	0,693472372	0,423750915	1,056992516	0,939662774	0,842716009
MGS	1,596817409	0,330605491	0,144914809	0,045905802	0,044090095	0,128800952	2,406147359	0,461204482

Anexo 10 – Idade, raça, paridade, prática de exercícios físicos e fase do ciclo menstrual das pacientes submetidas à laqueadura tubária.

Iniciais	Idade		Fase do
			Ciclo
			Menstrual
VDR		31	Folicular
MHS		26	Folicular
MEGC		29	Folicular
AS		39	Folicular
MAJF		32	Lútea
CAAS		24	Lútea
MLO		30	Lútea
VMS		31	Folicular
CSA		36	Folicular
<b>PGOS</b>		29	Folicular
COJ		28	Lútea
NMAB		27	Lútea
SMS		34	Lútea
MJSL		33	Folicular
SRS		31	Folicular
SMK		34	Lútea
SDF		34	Lútea
MLS		32	Folicular
LLS		34	Lútea
IASQ		33	Folicular
CMS		38	Lútea
SRS		29	Lútea
VAF		35	Lútea
EMD		30	Folicular
SDM		29	Folicular
EMS		35	Lútea
EUR		33	Lútea
JUJ		33	Folicular
LOM		29	Lútea
MLB		33	Folicular
PZF		37	Lútea
LHJM		35	Folicular

Anexo 11 – Idade, raça, paridade, prática de exercícios físicos e fase do ciclo menstrual das pacientes com endometriose de retossigmóide.

Iniciais	Idade		Fase do
			Ciclo
			Menstrual
GHM		30	Folicular
FFB		36	Lútea
MEGC		41	Folicular
ASS		30	Lútea
MDM		29	Lútea
MFD		35	Lútea
ACC		37	Lútea
MLB		40	Lútea
MFD		25	Lútea
AAS		38	Lútea
MFD		33	Folicular
DRB		34	Folicular
SFR		39	Folicular
MFE		30	Lútea
ASD		32	Lútea
PLS		33	Lútea
SET		37	Lútea
SDF		36	Folicular
FF		45	Folicular
IA		27	Folicular
MS		30	Lútea
PBB		34	Lútea

Anexo 12 – Idade, raça, paridade, prática de exercícios físicos e fase do ciclo menstrual das pacientes com endometriose retrocervical.

Iniciais	Idade		Fase do
			Ciclo
			Menstrual
PPD		34	Lútea
MFC		36	Lútea
MJS		47	Lútea
FV		35	Lútea
CI		32	Lútea
CP		31	Folicular
CC		38	Folicular
ADV		27	Folicular
EDT		29	Folicular
MGS		38	Folicular

Anexo 13 – Queixas clínicas das pacientes submetidas à laqueadura tubária (notas atribuídas por meio da aplicação da escala visual analógica de dor)

Iniciais	Dismenorréia	Dispareunia de profundidade	Dor pélvica crônica	Altera Intesti		Alteração Urinária
VDR	0	0	(	)	0	0
MHS	0	0		Ď	0	0
MEGC	5	0		)	0	0
AS	0	0			0	0
MAJF	6	0	(	)	0	0
CAAS	4	0	(	)	0	0
MLO	2	0	(	)	0	0
VMS	0	0	(	)	0	0
CSA	4	0	(	)	0	0
<b>PGOS</b>	5	0	(	)	0	0
COJ	0	0	(	)	0	0
NMAB	0	0	(	)	0	0
SMS	0	0		)	0	0
MJSL	0	0		)	0	0
SRS	0	0		)	0	0
SMK	0	0		)	0	0
SDF	2	0		)	0	0
MLS	0	0		)	0	0
LLS	0	0		)	0	0
IASQ	0	0		)	0	0
CMS	0	0		)	0	0
SRS	0	0		)	0	0
VAF	0	0		)	0	0
EMD	0	0		)	0	0
SDM	0	0		)	0	0
EMS	2	0		)	0	0
EUR	3	0		)	0	0
JUJ LOM	2 4	_		)	_	0
MLB	5 5	0		)	0	0 0
PZF	0	0		)	0	0
PZF LHJM	0	0	(		0	0
LI IJIVI	U	U		,	U	U

Anexo 14 – Queixas clínicas das pacientes com endometriose de retossigmóide (notas atribuídas por meio da aplicação da escala visual analógica de dor)

Iniciais	Dismenorréia	Dispareunia de	Dor pélvica		ração stinal	Alteração Urinária
		profundidade	crônica			
GHM	0	0	(	0	0	0
FFB	0	0	(	0	0	0
MEGC	5	0	(	0	0	0
ASS	0	0	(	0	0	0
MDM	6	0	(	0	0	0
MFD	4	0	(	0	0	0
ACC	2	0	(	0	0	0
MLB	0	0	(	0	0	0
MFD	4	0	(	0	0	0
AAS	5	0	(	0	0	0
MFD	0	0	(	0	0	0
DRB	0	0	(	0	0	0
SFR	0	0	(	0	0	0
MFE	0	0	(	0	0	0
ASD	0	0	(	0	0	0
PLS	0	0	(	0	0	0
SET	2	0	(	0	0	0
SDF	0	0	(	0	0	0
FF	0	0	(	0	0	0
IA	0	0	(	0	0	0
MS	0	0	(	)	0	0
PBB	0	0	(	0	0	0

Anexo 15 – Queixas clínicas das pacientes com endometriose retrocervical (notas atribuídas através da aplicação da escala visual analógica de dor)

Iniciais	Dismenorréia	Dispareunia de	Dor pélvica			Alteração Urinária
		profundidade	crônica			
PPD	8	6	2	2	5	0
MFC	10	1		2	1	0
MJS	0	1	(	0	0	0
FV	0	0	(	0	0	0
CI	9	3	2	2	0	0
CP	5	0	(	0	0	0
CC	9	5	8	8	0	0
ADV	10	7	(	0	10	0
EDT	8	0	8	8	0	0
MGS	10	0	(	0	5	0

Abbas A, Lichtman A and Pillai S. Imunidade inata In Imunologia celular e molecular. 2011. Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 55-88.

Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, Jr., Averbach M, Garry R, Silva LFF and Carvalho FM. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. Fertility and Sterility 2006; 86:543-547.

Acién P, Velasco I. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. ISRN Obstet Gynecol. 2013 Jul 17;2013:242149.

Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? Gynecol Obstet Invest 2006;62:139-47.

Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe GM, Markham R, Fraser IS. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study. Hum Reprod. 2009 Dec;24(12):3019-24.

André GM, Barbosa CP, Teles JS, Vilarino FL, Christofolini DM, Bianco B. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis. Fertil Steril 2011;95:2223-7.

Arina A, Murillo O, Dubrot J, Azpilikueta A, Alfaro C, Perez-Gracia JL, Bendandi M, Palencia B, Hervas-Stubbs S and Melero I. Cellular liaisons of natural killer lymphocytes in immunology and immunotherapy of cancer. Expert Opinion on Biological Therapy 2007; 7:599-615.

Arruda MS, Petta CA, Abrao MS and Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. Human Reproduction 2003; 18:756-759.

Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. Autoimmun Rev. 2008 May;7(5):370-5.

Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Matsushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. Cytokine 2003; 21:48-49.

Barrier BF. Immunology of endometriosis. Clin Obstet Gynecol 2010;53:397-402.

Basta P, Majka M, Jozwicki W, Lukaszewska E, Knafel A, Grabiec M, et al. The frequency of CD25+CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in ectopic endometrium and ectopic decidua. Reprod Biol Endocrinol 2010;8:116.

Bellelis P, Dias JA, Podgaec S, Gonzales M, Baracat EC and Abrão MS. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis—a case series. Rev Assoc Med Bras 2010; 56:467-471.

Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, Tokushige N, Ganewatta S, Markham R, Russell P and Fraser IS. The role of Foxp3+regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. Human Reproduction 2010; 25:900-907.

Berbic M, Fraser IS. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. J Reprod Immunol 2011;88:149-55.

Berbic M, Fraser IS. Immunology of normal and abnormal menstruation. Womens Health (Lond Engl). 2013 Jul;9(4):387-95.

Berkkanoglu M and Arici A. Immunology and endometriosis. American Journal of Reproductive Immunology 2003; 50:48-59.

Boyman O, Krieg C, Homann D and Sprent J. Homeostatic maintenance of T cells and natural killer cells. Cellular and Molecular Life Sciences 2012; 69:1597-1608.

Braundmeier A, Jackson K, Hastings J, Koehler J, Nowak R and Fazleabas A. Induction of endometriosis alters the peripheral and endometrial regulatory T

cell population in the non-human primate. Human Reproduction 2012; 27:1712-1722.

Bulun SE. Mechanisms of Disease Endometriosis. New England Journal of Medicine 2009; 360:268-279.

Budiu RA, Diaconu I, Chrissluis R, Dricu A, Edwards RP, Vlad AM. A conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis shows the presence of anti-MUC1 antibodies and Foxp3+ regulatory T cells. Dis Model Mech 2009;2:593-603.

Cameron MJ and Kelvin DJ. Cytokines and chemokines - Their receptors and their genes: An overview. Cytokines and Chemokines in Autoimmune Disease 2003; 520:8-32.

Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, Thompson DA, et al. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. J Cell Biol 1998;141:1053–9.

Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, et al. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. J Immunol 2001;166:6477–82.

Clore GM and Gronenborn AM. 3-Dimensional structures of alphachemokines and beta-chemokines. Faseb Journal 1995; 9:57-62.

Corthay A. How do regulatory T cells work? Scand J Immunol. 2009 Oct;70(4):326-36.

Cramer DW, Titus-Ernstoff L, McKolanis JR, Welch WR, Vitonis AF, Berkowitz RS and Finn OJ. Conditions associated with antibodiesagainst the tumor-associated antigen MUC1 and their relationship to risk for ovarian cancer. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005;14:1125-1131.

Dias Jr JA, Oliveira RM, Podgaec S, Abrao MS. Endometriosis and immunology: is the dosage of the natural killer cells relevant? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2005;123:S14-5.

Dias JA, Jr., Podgaec S, de Oliveira RM, Carnevale Marin ML, Baracat EC and Abrao MS. Patients With Endometriosis of the Rectosigmoid Have a Higher Percentage of Natural Killer Cells in Peripheral Blood. Journal of Minimally Invasive Gynecology 2012; 19:317-324.

Dong VM, McDermott DH and Abdi R. Chemokines and diseases. European Journal of Dermatology 2003; 13:224-230.

Ekman AK, Sigurdardottir G, Carlström M, Kartul N, Jenmalm MC, Enerbäck C. Systemically elevated Th1-, Th2- and Th17-associated chemokines in psoriasis vulgaris before and after ultraviolet B treatment. Acta Derm Venereol. 2013 Sep 4;93(5):527-31.

Engel I and Kronenberg M. Making memory at birth: understanding the differentiation of natural killer T cells. Current Opinion in Immunology 2012; 24:184-190.

Fairbanks F, Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, Jr., de Oliveira RM and Rizzo LV. Interleukin-12 but not interieukin-18 is associated with severe endometriosis. Fertility and Sterility 2009; 91:320-324.

Fassbender A, Overbergh L, Verdrengh E, Kyama CM, Vodolazakaia A, Bokor A, et al. How can macroscopically normal peritoneum contribute to the pathogenesis of endometriosis? Fertil Steril 2011;96:697-9.

Filaci G, Fenoglio D and Indiveri F. CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. Autoimmunity 2011; 44:51-57.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG and Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FoxP3. Immunity 2005; 22:329-341.

Furuya M, Suyama T, Usui H, Kasuya Y, Nishiyama M, Tanaka N, et al. Upregulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. Hum Pathol 2007;38:1676–87.

Gao X, Yeh YC, Outley J, Simon J, Botteman M and Spalding J. Health-related quality of life burden of women with endometriosis: a literature review. Curr Med Res Opin 2006; 22:1787-1797.

Glace L, Grygielko ET, Boyle R, Wang Q, Laping NJ, Sulpizio AC, et al. Estrogen-induced stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/Cxcl12) expression is repressed by progesterone and by Selective Estrogen Receptor Modulators via estrogen receptor alpha in rat uterine cells and tissues. Steroids 2009;74:1015-24.

Gonçalves R, Teixeira A, Campos W and Orefice F. O papel das quimiocinas nas uveítes. . 2007 Arq Bras Oftalmol pp. 363-370.

Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. Immunol Cell Biol. 2011 Feb;89(2):207-15.

Harada T, Iwabe T and Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. Fertility and Sterility 2001; 76:1-10.

Heilier J-F, Donnez J, Nackers F, Rousseau R, Verougstraete V, Rosenkranz K, Donnez O, Grandjean F, Lison D and Tonglet R. Environmental and host-associated risk factors in endometriosis and deep endometriotic nodules: A matched case-control study. Environmental Research 2007; 103:121-129.

Heiseke AF, Faul AC, Lehr HA, Förster I, Schmid RM, Krug AB, et al. CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis. Gastroenterology 2012;142:335-45.

Hemmings R, Rivard M, Olive DL, Poliquin-Fleury J, Gagne D, Hugo P and Gosselin D. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. Fertility and Sterility 2004; 81:1513-1521.

Herington JL, Bruner-Tran KL, Lucas JA, Osteen KG. Immune interactions in endometriosis. Expert Rev Clin Immunol 2011;7:611-26.

Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril 1988;50:216-22.

Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. Blood 2001;97:367–75.

Iwasaki K, Makino T, Maruyama T, Matsubayashi H, Nozawa S and Yokokura T. Leukocyte subpopulations and natural-killer activity in endometriosis. International Journal of Fertility 1993; 38:229-234.

Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. Immunity 2008;28:559–70.

Jonuleit H and Schmitt E. The regulatory T cell family: Distinct subsets and their interrelations. Journal of Immunology 2003; 171:6323-6327.

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol. 2012;30:531-64.

Kashima K, Ishimaru T, Okamura H, Suginami H, Ikuma K, Murakami T, Iwashita M and Tanaka K. Familial risk among Japanese patients with endometriosis. International Journal of Gynecology & Obstetrics 2004; 84:61-64.

Kikuchi Y, Ishikawa N, Hirata J, Imaizumi E, Sasa H and Nagata I. Changes of peripheral-blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica 1993; 72:157-161.

Kim CH, Pelus LM, Appelbaum E, Johanson K, Anzai N, Broxmeyer HE. CCR7 ligands, SLC/6Ckine/Exodus2/TCA4 and CKbeta-11/MIP-3beta/ELC,

are chemoattractants for CD56(+)CD16(-) NK cells and late stage lymphoid progenitors. Cell Immunol 1999;193:226 –35.

Kirkwood BR and Sterne JAC. Essential medical statistics. 2006. Blackwell Science: Massachusetts, USA. p.502.

Koninckx PR and Martin DC. Deep endometriosis - a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa. Fertility and Sterility 1992; 58:924-928.

Linsen L, Somers V, Stinissen P. Immunoregulation of autoimmunity by natural killer T cells. Hum Immunol. 2005 Dec;66(12):1193-202.

Loetscher P and Moser B. Homing chemokines in rheumatoid arthritis. Arthritis Research 2002; 4:233-236.

Long SA and Buckner JH. CD4(+)FOXP3(+) T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game. Journal of Immunology 2011; 187:2061-2066.

Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Oguri H, Kusume T and Fukaya T. Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. Fertility and Sterility 2002; 77:297-302.

Maloy KJ and Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. Nature Immunology 2001; 2:816-822.

Matsubayashi H, Hosaka T, Sugiyama Y, Suzuki T, Arai T, Kondo A, et al. Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women. Am J Reprod Immunol 2001;46:318-22.

Menetrier-Caux C, Curiel T, Faget J, Manuel M, Caux C and Zou W. Targeting regulatory T cells. Targeted Oncology 2012; 7:15-28.

Meyer R. Uber den staude der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyonetitis sarcomatosa. 1919. Zentralbl Gynakol, German, pp. 745-759.

Morris MA, Ley K. Trafficking of natural killer cells. Curr Mol Med. 2004 Jun;4(4):431-8.

Moser B and Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. Nature Immunology 2001; 2:123-128.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ and Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 1996. Ilinois: Richard D. Irwing. p1408.

Nishida M, Nasu K, Narahara H. Role of chemokines in the pathogenesis of endometriosis. Front Biosci 2011;3:1196-204.

Oei AL, Moreno M, Verheijen RH, Sweep FC, Thomas CM, Massuger LF and von Mensdorff-Pouilly S. Induction of IgG antibodies to MUC1 and survival in patients with epithelial ovarian cancer. Int. J. Cancer 2008;123:1848-1853.

Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M and Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural-killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. Fertility and Sterility 1991; 56:45-51.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M and Koninckx PR. The natural-killer activity of peritoneal-fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. Fertility and Sterility 1992; 58:290-295.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR. Transforming growth factor-beta activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. Obstet Gynecol 1994;83:287-92.

Ota H, Rong H, Igarashi S and Tanaka T. Suppression of natural killer cell activity by splenocyte transplantation in a rat model of endometriosis. Human Reproduction 2002; 17:1453-1458.

Park SG, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS, et al. T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing gammadelta T cells. Immunity 2010;33:791–803.

Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. Toxicol Pathol. 2012;40(2):186-204.

Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Jr., Rizzo LV, de Oliveira RM and Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. Human Reproduction 2007; 22:1373-1379.

Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C, de Oliveira RM, Baracat EC and Abrao MS. TH1 and TH2 immune responses related to pelvic endometriosis. Revista Da Associacao Medica Brasileira 2010; 56:92-98.

Podgaec S, Goncalves MO, Klajner S and Abrao MS. Epigastric pain relating to menses can be a symptom of bowel endometriosis. Sao Paulo Medical Journal 2008; 126:242-244.

Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LFC, Baracat EC, Abrao MS. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Cells Increased in the Peritoneal Fluid of Patients with Endometriosis. American Journal of Reproductive Immunology 2012; 68: 301-308.

Prieto GA. Progression of endometriosis to cancer: too MUCh FoxP3+ regulatory T-cell response? Dis Model Mech 2011;4:139-40.

Qin S, Sui Y, Soloff AC, Junecko BAF, Kirschner DE, Murphey-Corb MA, Watkins SC, Tarwater PM, Pease JE, Barratt-Boyes SM et al. Chemokine and cytokine mediated loss of regulatory T cells in lymph nodes during pathogenic simian immunodeficiency virus infection. Journal of Immunology 2008; 180:5530-5536.

Raman D, Baugher PJ, Thu YM and Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. Cancer Letters 2007; 256:137-165.

Raman D, Sobolik-Delmaire T and Richmond A. Chemokines in health and disease. Experimental Cell Research 2011; 317:575-589.

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997;67:817-21.

Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. Journal of Leukocyte Biology 2002; 71:173-183.

Rollins BJ. Chemokines. Blood 1997; 90:909-928.

Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, et al. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCR gammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. Blood 2001;97:601–7.

Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. Immunological Reviews 2011; 241:260-268.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM and Hafler DA. FOXP3(+) regulatory T cells in the human immune system. Nature Reviews Immunology 2010; 10:490-500.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M. Immunological self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25) - breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune-diseases. Journal of Immunology 1995; 155:1151-1164.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR and Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. Journal of Experimental Medicine 1998; 187:875-883.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1927; 14:422-469.

Seddon B and Mason D. The third function of the thymus. Immunology Today 2000; 21:95-99.

Selmi C. Autoimmunity in 2010. Autoimmunity Reviews 2011; 10:725-732.

Sikora J, Mielczarek-Palacz A and Kondera-Anasz Z. Role of Natural Killer Cell Activity in the Pathogenesis of Endometriosis. Current Medicinal Chemistry 2011; 18:200-208.

Shimoya K, Zhang Q, Temma-Asano K, Hayashi S, Kimura T, Murata Y. Fractalkine in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Int J Gynaecol Obstet 2005;91:36-41.

Singer JM and Andrade DF. Analysis of longitudinal data. In Handbook of Statistics. 2000. Bio-Environmental and Public Health Statistics. P.K. Sen and C.R. Rao. Amsterdam: North Holland. pp115-160.

Stefanson H, Geirsson RT, Steinthorsdottir V, Jonsson H, Manolescu A, Kong A, Ingadottir G, Gulcher J and Stefansson K. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. Human Reproduction 2002; 17:555-559.

Tanaka E, Sendo F, Kawagoe S and Hiroi M. Decreased natural-killer-cell activity in women with endometriosis. Gynecologic and Obstetric Investigation 1992; 34:27-30.

Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytolysis. J Immunol 1995;155:3877–88.

Ulukus M, Ulukus EC, Goker ENT, Tavmergen E, Zheng W and Arici A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. Fertility and Sterility 2009; 91:687-693.

Vercellini P, Fedele L, Aimi G, Pietropaolo G, Consonni D and Crosignani PG. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. Hum Reprod 2007; 22:266-271.

Vicari AP and Caux C. Chemokines in cancer. Cytokine & Growth Factor Reviews 2002; 13:143-154.

Viganò P, Parazzini F, Somigliana E and Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18:177-200.

Vinatier D, Orazi G, Cosson M and Dufour P. Theories of endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001; 96:21-34.

Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM and Ugolini S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. Science 2011; 331:44-49.

Waldmann H and Cobbold S. Regulating the immune response to transplants: A role for CD4(+) regulatory cells? Immunity 2001; 14:399-406.

Watanabe M, Shimoya K, Zhang Q, Temma-Asano K, Kimura T, Murata Y. The expression of fractalkine in the endometrium during the menstrual cycle. Int J Gynaecol Obstet 2006;92:242-7.

Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A, Okazaki T, et al. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. J Immunol 2000;164:4055-62.

Zhang Q, Shimoya K, Temma K, Kimura T, Tsujie T, Shioji M, et al. Expression of fractalkine in the Fallopian tube and of CX3CR1 in sperm. Hum Reprod 2004;19:409-14.

9. ARTIGO PUBLICADO

# Transcriptional changes in the expression of chemokines related to natural killer and T-regulatory cells in patients with deep infiltrative endometriosis

Patrick Bellelis, M.D., <sup>a</sup> Denise Frediani Barbeiro, M.D., <sup>b</sup> Luiz Vicente Rizzo, M.D., Ph.D., <sup>c</sup> Edmund Chada Baracat, M.D., Ph.D., <sup>a</sup> Mauricio Simões Abrão, M.D., Ph.D., <sup>a</sup> and Sergio Podgaec, M.D., Ph.D.

<sup>a</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, University of São Paulo, <sup>b</sup> Medical Investigation Laboratory (LIM 51), School of Medicine, University of São Paulo, and <sup>c</sup> Albert Einstein Israeli Hospital, São Paulo, Brazil

**Objective:** To evaluate the expression of chemokines that regulate natural killer (NK) and T-regulatory (T-reg) cell activity in eutopic and ectopic endometrial tissue samples from endometriosis patients.

Design: Case-control study (Canadian Task Force classification II-2).

**Setting:** Tertiary referral hospital.

Patient(s): Sixty-four consecutive patients with and without endometriosis.

**Intervention(s):** After videolaparoscopy, patients were divided into three groups: bowel endometriosis (n = 22), retrocervical endometriosis (n = 10), and endometriosis-free women (n = 32).

**Main Outcome Measure(s):** Gene expression of the chemokines that regulate NK (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1, and CX3CL1) and T-reg cell activity (CCL17 and CCL21) evaluated by real-time polymerase chain reaction.

**Result(s):** Of the chemokines associated with NK cells, CX3CL1 and CXCL12 expression was statistically significantly greater in the foci of endometriosis compared with the eutopic endometrium in patients and controls. From the chemokines associated with T-reg cells, CCL17 expression was statistically significantly greater in the eutopic endometrium of the patients with rectosigmoid endometriosis compared with the foci of endometriosis or eutopic endometrium of the patients with retrocervical endometriosis or the disease-free women.

Conclusion(s): Both T-reg and NK cells mediate inflammatory response and may play a fundamental role in endometriosis by causing

an impaired clearing of endometrial cells. Establishing how CCL17, CXCL12, and CX3CL1 modulate this response is essential to understanding inflammatory responses in endometriosis. (Fertil Steril® 2013;99:1987–93. ©2013 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Chemokines, endometriosis, endometrium, NK cells, T-regulatory cells

**Discuss:** You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at http://fertstertforum.com/bellelisp-chemokines-nk-t-regulatory-cells-endometriosis/



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.\*

\* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

n recent years, a number of studies have been published on the role of immunologic factors in the pathogenesis of endometriosis. Endometriotic lesions have been associated with the presence of various cytokines and with various

types of inflammatory response (1–3). In this respect, the balance between immunity and tolerance is important to maintain immune homeostasis, thus justifying the many mechanisms involved in keeping the immune

activity of the natural killer (NK) and T-regulatory (T-reg) cells (4–6).

Natural killer cells play a major role

response under control, including the

Natural killer cells play a major role in the immune system of vertebrates, and they constitute an important part of the innate immune response. These lymphocytes are capable of differentiating between virus-infected cells, neoplastic cells, and normal cells (7). Natural killer cells can recognize the major histocompatibility complex (MHC) expressed on the surface of potential target cells and can eliminate

Received September 24, 2012; revised February 18, 2013; accepted February 20, 2013; published online March 18, 2013.

P.B. has nothing to disclose. D.F.B. has nothing to disclose. L.V.R. has nothing to disclose. E.C.B. has nothing to disclose. M.S.A. has nothing to disclose. S.P. has nothing to disclose.

Supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo. Grant # 2010/00475-0. Reprint requests: Patrick Bellelis, M.D., Rua Dr. Homem de Mello, 1020, Perdizes, 05007–002 São Paulo, Brazil (E-mail: pbellelis@gmail.com).

Fertility and Sterility® Vol. 99, No. 7, June 2013 0015-0282/\$36.00 Copyright ©2013 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.038

these targets accordingly. Cells expressing MHC class I molecules are identified as normal self-cells, but cells that do not express MHC class I molecules are destroyed.

Expression of MHC class I has been extensively studied in pregnancy, cancer, and in immune response in general. It is well known that all normal human body cells express MHC class I on their cell surface, as endometrial cells do (8, 9). Therefore, in endometriosis, it is reasonable to assume that NK cells participate in the immune response against the endometrial cells that are regurgitated through the tubes into the abdominal cavity during menstruation (10).

T-regulatory cells, first described by Sakaguchi et al. (11) in 1995, can be activated by self or non-self antigens; once they are activated, they can suppress T cells in a non-antigen-specific manner (12, 13). Berbic et al. (14) found an increase in Foxp3, the most specific marker of T-reg cells, in the eutopic endometrium of patients with endometriosis during the secretory phase of the menstrual cycle. The role played by these cells in the inflammation process appears to be important in coordinating the immune response against ectopic endometrial cells. Consequently, cells such as T-reg and NK cells that mediate inflammatory response appear to play a fundamental role in endometriosis by causing an impaired clearance of endometrial cells.

Because T-reg cells exert their function by producing inhibitory cytokines, it has been speculated that the endometrial cells present in the peritoneal cavity fail to be eliminated because of a defective immune response. This defective response would be due to a decrease in the activity of NK cells, macrophages, dendritic cells, or CD4 and CD8 lymphocytes that may be suppressed by the action of the T-reg cells (15, 16). However, studies have reported conflicting results, with some reporting that the number of NK cells decrease (4), increase (17, 18), remained unchanged (19), or vary in accordance with the stage (20) of the disease (21). As reported by our group, in patients with endometriosis, particularly those with advanced stages of the disease such as rectosigmoid endometriosis, the concentration of NK cells in peripheral blood is higher (16). Furthermore, the concentration of T-reg cells in the peritoneal fluid of patients with endometriosis has also been found to be higher compared with that of women without endometriosis (22).

It has been well established that T-reg cells in humans are regulated by the CCL17 and CCL21 chemokines (ligands of CCR4 and CCR7), which can modulate the activity of T-reg cells in the tissues by, respectively, hampering or exacerbating these responses. It is also understood that the migration of NK cells increases in response to the presence of certain chemokines such as CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1, and CX3CL1. The cytolytic activity of NK cells may increase in response to CXCL10 and CX3CL1 as well (5, 23). Therefore, we evaluated the expression of the chemokines that regulate the activity of the NK and T-reg cells in eutopic and ectopic endometrial tissue samples from patients with endometriosis.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was conducted in the endometriosis division of the Department of Gynecology at the University of São Paulo School of Medicine's Teaching Hospital, between August 2010 and May 2011. The study was approved by the institution's internal review board under reference 0025/10, and all the patients read and signed an informed consent form.

Sixty-four patients consecutively attending the endometriosis clinic were admitted to the study. Women with pelvic pain and a suspicion of endometriosis were evaluated based on clinical symptoms, a physical examination, and a transvaginal ultrasonography during which a specific protocol was used to map the disease (24). Surgical treatment by laparoscopy was indicated whenever the patient's clinical condition failed to improve with hormone therapy and/or when the imaging exam suggested severe lesions of deep endometriosis affecting the rectosigmoid and retrocervical region. Biopsies were performed during the surgical procedure to obtain histologic confirmation of the disease. The total number of patients was determined by the number of procedures expected to be performed in this department within the referred time frame.

The inclusion criteria for the patients with endometriosis were age 18 to 40 years, bowel/retrocervical endometriosis confirmed by histology, and no autoimmune diseases as confirmed by anamnesis, a physical examination, and laboratory tests, requested whenever necessary. In addition, patients had to have normal menstrual cycles at intervals of 26 to 34 days, and should not have used hormone therapy, including GnRH analogues, progestogens, or oral contraceptives, in the 3 months preceding surgery. Accordingly, all endometriosis patients who were undergoing hormone treatment (such as progesterone or combined oral contraceptives) interrupted their treatment at least 3 months before surgery.

The inclusion criteria for the group of women without endometriosis were the same as those applied to the previous group with the exception of the requirement for histologic confirmation of endometriosis. These women were undergoing tubal ligation as a permanent method of contraception. In both groups, the day of the menstrual cycle on the day of surgery was recorded, thus determining the phase of the cycle (luteal or follicular).

The patients were then divided into three groups: bowel endometriosis (group A, n=22 patients), retrocervical endometriosis (group B, n=10 patients), and women without the disease (group C, control, n=32 patients). After anesthesia and with the patient placed in position, a sample of the eutopic endometrium was collected using a Pipelle curette (groups A, B, and C). During surgery, tissue samples were obtained from the ectopic endometrium (groups A and B). The tissue samples from the eutopic and ectopic endometrium were divided into two equal parts and sent to the laboratory to be stored until analysis.

Gene expression was determined by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using the B2m gene as a housekeeping gene. The total RNA was isolated from the eutopic and ectopic endometrium in the biopsy samples according to a standard Trizol RNA isolation protocol (Invitrogen). Samples of total RNA were quantified by measuring the optical density at 260 nm (Nano Vue Plus Spectrophotometer; GE). All RT-PCR reaction mixtures were prepared using Superscript Platinum III One-Step kits with incorporated SYBR Green (11736-051; Invitrogen).

The production of complementary DNA (cDNA) and DNA amplification were performed on a Step One thermocycler (Applied Biosystems), and the amplification products were confirmed on a 1.5% agarose gel. The primers used were as follows: CCL17 sense, 5'-ACTGAAGATGCTGGCCCTGGTC-3'; CCL17 reverse, 5'-AAACGATGGCATCCCTGGAGC-3'; CCL21 sense, 5'-CCCAGCTATCCTGTTCTTGC-3'; CCL21 reverse, 5'-TCAGTCCTCTTGCAGCCTTT-3'; CXCL9 sense, 5'-TGCTGGT TCTGATTGGAGTG-3'; CXCL9 reverse, 5'-TTTGGCTGACCT GTTTCTCC-3'; CXCL10 sense, 5'-CTGTACGCTGTACCTGC ATCA-3': CXCL10 reverse, 5'-TTCTTGATGGCCTTCGATTC-3': CXCL11 sense, 5'-AGAGGACGCTGTCTTTGCAT-3'; CXCL11 reverse, 5'-TGGGATTTAGGCATCGTTGT-3'; CXCL12 sense, 5'-GTCAGCCTGAGCTACAGATGC-3'; CXCL12 reverse, 5'-CT TTAGCTTCGGGTCAATGC-3'; XCL1 sense, 5'-TGGCATCT GCTCTCTCACTG-3'; XCL1 reverse, 5'-ATTTCCTGTCCATG CTCCTG-3'; CX3CL1 sense, 5'-TCTGCCATCTGACTGTCCTG-3'; and CX3CL1 reverse, 5'-CTGTGCTGTCTCGTCTCCAA-3'. Reverse transcription was performed at 45°C for 30 minutes, 95°C for 5 minutes, and 5°C for 5 minutes. After reverse transcription, PCR was performed under the following conditions: 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 35 cycles. The fold change was represented as  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test were used to compare the results of the chemokines, and the Mann-Whitney nonparametric test was used to compare clinical characteristics. The tests were performed using the SAS software program, version 8.0 (SAS Inc.) and the SPSS statistical software package, version 15.0 (SPSS Inc.). P<.05 was considered statistically significant.

# **RESULTS**

The mean age of the patients in group A was  $34.14 \pm 4.87$  years compared with  $34.70 \pm 5.66$  years for the patients in group B and  $31.97 \pm 3.46$  years for those in group C. The groups were not statistically significantly different with respect to age or parity (Table 1). In addition, the phases of the menstrual cycle at the time of surgery were similar in the group of patients with endometriosis and the group without endometriosis, with a similar number of patients and controls in the follicular and luteal phases of the menstrual cycle.

Regarding the chemokines related to NK cell activity (Fig. 1), statistically significant differences were found between the groups or sites of evaluation with respect to the mean levels of CX3CL1 and CXCL12 (P<.05). Of those related to T-reg cell activity (Fig. 2), statistically significant differences were found only for CCL17 (P<.05). When chemokine expression in the eutopic endometrium was compared according to the phase of the menstrual cycle, no statistically significant differences were found between the follicular and luteal phases (Table 2). CX3CL1 (fractalkine) was expressed to a greater extent in the eutopic endometrium of women with retrocervical lesions compared with the other groups (P<.05).

With respect to CXCL9 (MIG), CXCL10, CXCL11, and XCL1, no statistically significant differences were identified between the groups or sites (*P*>.05); although there did appear to be some trends, the high standard error did not permit

this hypothesis to be confirmed. Both in the patients with retrocervical endometriosis and in those with rectosigmoid lesions, CXCL12 (SDF-1a) expression was greater in the foci of endometriosis compared with the eutopic endometrium (P<.05). Of the chemokines associated with T-reg cell activity, CCL17 (TARC) was expressed to a greater extent in the eutopic endometrium of patients with lesions of endometriosis in the rectosigmoid compared with the other groups (P<.05).

### DISCUSSION

In recent years, research in endometriosis has focused on the etiopathogenesis of the disease (25). Although new hypotheses have been raised, studies have found evidence that the theory of retrograde menstruation, taken together with immunologic factors, appears to play a significant role in the genesis of this disease (15, 16, 26, 27).

Chemokines are a group of at least 47 correlated proteins, making them the largest family of cytokines known (23, 28). Depending on the number and spacing of their conserved cysteine residues, chemokines are classified into four groups: CXC (or a), CC (or b), CX<sub>3</sub>C, and the C subfamilies. Each chemokine can bind to more than one receptor, and each receptor interacts with more than one chemokine (29).

The correlation between T-reg and NK cell activity in endometriosis remains poorly understood. If we further consider that their effects can be modulated by other mediators of the inflammatory response such as the chemokines, then the range of questions that remains to be answered is even larger.

Basta et al. (30) found differences in Foxp3<sup>+</sup> CD4 levels when tissue samples from ectopic pregnancy, eutopic secretory endometrium, and ovarian endometriomas were compared. Those investigators speculated that the disturbances in the equilibrium of the last two might be due to alterations in the population of T-reg cells at these sites.

Reviewing the role of T-reg cells in the pathogenesis of endometriosis, Berbic and Fraser (31) showed that in patients with endometriosis Foxp3<sup>+</sup> CD4 levels did not decrease as expected in the secretory phase, which may contribute toward reducing the ability of newly recruited leukocytes to initiate effective immune responses against the endometrial fragments that invade the peritoneal cavity.

Despite those findings published in the literature, our study found no differences in chemokine expression when it was evaluated in accordance with the phase of the menstrual cycle. Moreover, although the phase of the menstrual cycle at the time of surgery was not controlled, there were a similar number of patients and controls in the follicular and luteal phases of the menstrual cycle and no statistically significant differences between the groups.

André et al. (32) reported the presence of certain polymorphisms in Foxp3 in infertile patients with endometriosis compared with healthy women. Therefore, the genetic aspect certainly appears to play an important part in the genesis of endometriosis; however, much still remains to be investigated with respect to the immunologic theory.

Qin et al. (5) showed that T-reg cells and their principal marker Foxp3 are affected by some chemokines (CCL17 and CCL21), which may exacerbate or hamper their function. In

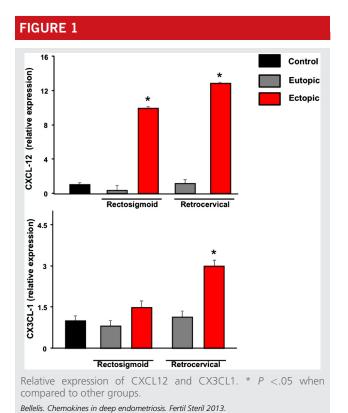
# TABLE 1

Clinical characteristics related to ethnicity, parity, and the practice of physical exercise in the patients with endometriosis and controls.											
	Co	ntrols	Rectosign	Rectosigmoid patients		rical patients	Total				
	n	%	n	%	n	%	n	%	P value		
Ethnicity									.001		
Caucasian	15	46.9	17	77.3	8	80.0	40	62.5			
African descent	17	53.1	2	9.1	2	20.0	21	32.8			
Asian descent	0	0.0	3	13.6	0	0.0	3	4.7			
Parity									.694		
None			17	77.3	7	70.0	24	75.0			
1			3	13.6	1	10.0	4	12.5			
>1			2	9.1	2	20.0	4	12.5			
Regular physical exercise									< .001		
Yes	0	0.0	13	59.1	4	40.0	17	26.6			
No	32	100.0	9	40.9	6	60.0	47	73.4			
Total	32	100.0	22	100.0	10	100.0	64	100.0			
Bellelis. Chemokines in deep endom	etriosis. Fert	il Steril 2013.									

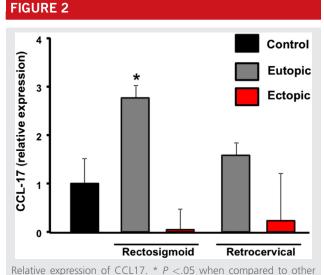
our study, a statistically significant difference was found in CCL17 chemokine expression. CCL17 is known to be able to modulate the effect of the T-reg cells (5, 33). Numerous studies have shown the effect of this chemokine on the genesis of bowel conditions such as Crohn disease (33–35). Experiments in CCL17-deficient rats confirmed that these animals failed to develop relevant clinical signs of autoimmune bowel disease, even when evaluated at different time points. Those results suggest that immune factors regulated in CCL17-deficient rats inhibit inflammation. Furthermore, in 2012, Heiseke et al. (33) showed that the clonal expansion of T-reg cells is more likely to be present in CCL17-deficient rats than in CCL17-competent rats; that is, a lack of CCL17 al-

lows T-reg cells to expand in number, thus enhancing immune response.

Consequently, a reduction in CCL17 concentration in the ectopic endometrium of patients with endometriosis affecting the rectosigmoid or in those with retrocervical lesions leads us to speculate on a possible association with the genesis of other autoimmune diseases. This reduction in CCL17 found in the ectopic endometrium of patients with rectosigmoid and retrocervical lesions permits the clonal expansion of T-reg cells at this site. This hypothesis is in agreement with reports by other investigators (14, 30, 36, 37); although these findings were not statistically significant, there was a clear tendency toward a decrease. The increased concentration of T-reg cells in the peritoneal fluid of patients with endometriosis and, furthermore, the increase in the number of these cells in ovarian endometriomas has led us to believe that this greater concentration results in a malfunction of the other cells of the immune system. Therefore, our findings complement the description of an environment that



1990



VOL. 99 NO. 7 / JUNE 2013

Bellelis. Chemokines in deep endometriosis. Fertil Steril 2013

TABLE 2

Description	of the chemokines in the euto	pic endometr	rium according to the phase	e of the me	nstrual cycle.		
			Ph	ase of the r	nenstrual cycle		
			Follicular phase			Luteal phase	
Variable	Group	Mean	Standard deviation	n	Mean	Standard deviation	n
XCL1	Control	1.640	1.802	16	1.341	1.409	16
	Patient (rectosigmoid)	0.946	1.135	8	0.714	0.926	14
61/6614	Patient (retrocervical)	0.985	0.482	5	0.700	0.312	5
CX3CL1	Control	1.279	1.032	16	1.317	1.497	16
	Patient (rectosigmoid)	1.053	0.857	8	0.986	0.620	14
61/616	Patient (retrocervical)	0.527	0.163	5	0.628	0.142	5
CXCL9	Control	1.324	1.086	16	2.817	5.869	16
	Patient (rectosigmoid)	0.995	1.184	8	0.930	1.296	14
61/61/6	Patient (retrocervical)	0.353	0.239	5	0.880	0.456	5
CXCL10	Control	1.269	1.314	16	3.615	9.493	16
	Patient (rectosigmoid)	0.656	0.440	8	1.073	1.031	14
	Patient (retrocervical)	0.531	0.397	5	0.707	0.337	5
CXCL11	Control	1.327	1.452	16	1.781	2.591	16
	Patient (rectosigmoid)	0.744	0.691	8	1.221	1.114	14
	Patient (retrocervical)	0.414	0.245	5	1.029	1.230	5
CXCL12	Control	1.489	1.403	16	1.372	1.074	16
	Patient (rectosigmoid)	1.695	2.679	8	1.521	2.572	14
	Patient (retrocervical)	2.203	1.596	5	1.118	0.722	5
CXCL17	Control	2.513	2.339	16	2.432	3.353	16
	Patient (rectosigmoid)	2.370	1.456	8	5.200	6.055	14
	Patient (retrocervical)	2.168	1.198	5	1.276	0.470	5
CCL21	Control	5.881	13.286	16	10.329	38.436	16
	Patient (rectosigmoid)	1.958	1.014	8	3.849	3.672	14
	Patient (retrocervical)	0.767	0.244	5	0.643	0.754	5
Bellelis. Chemoki	ines in deep endometriosis. Fertil Steril 2	013.					

encourages a greater concentration of these cells, which act so intensely on immune response. Moreover, the greater expression of CCL17 in the eutopic endometrium of patients with endometriosis of the rectosigmoid indicates the lower propensity for T-reg cells to concentrate at this location, allowing them to focus on the peritoneal cavity.

Together with other T and B cells, NK cells represent one of the major subsets of lymphocytes and have been identified in all species of vertebrates examined. These lymphocytes are different from the T and B cells and play an important role in innate immune response. The term "natural killer" originates from the fact that these cells can perform their function of killing without any requirement for the clonal expansion and/or differentiation required by other killer cells of the immune system such as the cytotoxic T lymphocytes (CTL) (23). Because NK cells participate in the clearance of the endometrial cells regurgitated into the peritoneal cavity, it is reasonable to speculate that they would be underactivated in endometriosis or would not recognize the ectopic endometrial tissue as being material in apoptosis that should be eliminated (4).

The migration of NK cells may increase in response to the presence of certain chemokines such as CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1, and CX3CL1. Additionally, an increase in their cytolytic activity may take place when NK cells are exposed to specific chemokines such as CXCL10 and CX3CL1 (38–44). The differences in the levels of some of the chemokines found in our study highlights the defective action of NK cells in patients with endometriosis. CX3CL1

(fractalkine) is one of the most studied chemokines in endometriosis (29, 45–47). Watanabe et al. (47) evaluated healthy women and showed that CX3CL1 is present to a greater extent in eutopic endometrium in the secretory phase of the cycle compared with the proliferative phase. Furthermore, those investigators suggested that its presence could be one of the factors responsible for regulating the immunologic milieu, attracting cells such as the NK cells.

Our study found a statistically significant difference with respect to the presence of CX3CL1 in the ectopic endometrium of the women with retrocervical lesions, where it was expressed to a greater extent compared with the eutopic endometrium of the women in the other groups. This may indicate an attempt by the organism to induce chemotaxis of defense cells such as the NK cells in an effort to reduce the damage caused by this disease.

CXCL12 (SDF-1a, stromal cell-derived factor-1) was identified as a gene product that is consistently regulated by estrogen and has also been associated with NK cell migration (48). Our study found lower levels in the eutopic endometrium of patients and controls compared with the ectopic endometrium. The fact that its levels are higher in the ectopic endometrium is surprising; however, using the same line of reasoning applied to CX3CL1, we believe this to be a response of the organism attempting to increase the concentration of defense cells against endometriosis. In 2009, Glace et al. (48) also showed an increase in CXCL12 levels in the ectopic endometrium when evaluating an animal model of ovarian endometriosis, and Furuya et al. (49) reported similar findings

in patients with ovarian endometriosis compared with disease-free patients.

Endometriosis is a condition that continues to be evaluated, and many questions remain to be clarified. The immunologic theory is currently the target of much research. A number of studies have approached endometriosis as an immunologic disease (1, 50, 51), and identification of a noninvasive diagnosis and a definitive or prophylactic treatment may well result from this theory. The action of cells that mediate inflammatory response, such as the T-reg and NK cells, when they are inactive, underactive, or even when functioning normally appears to play a fundamental role in the genesis and/or maintenance of this disease. Furthermore, as seen for the first time in our study, the role of certain chemokines in modulating this inflammatory response represents a fundamental key to understanding the inflammatory response in endometriosis. We measured mRNA levels to identify chemokine ligands and changes in receptors in cases of deep endometriosis, but it should be taken into consideration that posttranscriptional changes may also interfere in immune cascade processes.

### **REFERENCES**

- Podgaec S, Abrão MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a T<sub>H</sub>2 immune response component. Hum Reprod 2007;22:1373–9.
- Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. Am J Reprod Immunol 2003;50:48–59.
- Fairbanks F, Abrão MS, Podgaec S, Dias JA Jr, de Oliveira RM, Rizzo LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. Fertil Steril 2009;91:320–4.
- Ota H, Rong H, Igarashi S, Tanaka T. Suppression of natural killer cell activity by splenocyte transplantation in a rat model of endometriosis. Hum Reprod 2002;17:1453–8.
- Qin S, Sui Y, Soloff AC, Junecko BA, Kirschner DE, Murphey-Corb MA, et al. Chemokine and cytokine mediated loss of regulatory T cells in lymph nodes during pathogenic simian immunodeficiency virus infection. J Immunol 2008;180:5530–6.
- Engel I, Kronenberg M. Making memory at birth: understanding the differentiation of natural killer T cells. Curr Opin Immunol 2012;24:184–90.
- Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. Curr Med Chem 2011;18: 200–8.
- Bijen CB, Bantema-Joppe EJ, de Jong RA, Leffers N, Mourits MJ, Eggink HF, et al. The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. Int J Cancer 2010;126:1417–27.
- Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev 2005;206:306–35.
- Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Oguri H, Kusume T, Fukaya T. Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. Fertil Steril 2002;77:297–302.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995;155:1151–64.
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. J Immunol 2003;171:6323–7.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010;10:490–500.
- Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, Tokushige N, Ganewatta S, Markham R, et al. The role of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells in endometriosis:

- a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. Hum Reprod 2010;25:900–7.
- 15. Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C, Oliveira RM, Baracat EC, Abrão MS.  $T_{\rm H}1$  and  $T_{\rm H}2$  immune responses related to pelvic endometriosis. Rev Assoc Med Bras 2010;56:92–8.
- Dias JA Jr, Podgaec S, de Oliveira RM, Carnevale Marin ML, Baracat EC, Abrão MS. Patients with endometriosis of the rectosigmoid have a higher percentage of natural killer cells in peripheral blood. J Minim Invasive Gynecol 2012;19:317–24.
- Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril 1988;50:216–22.
- Matsubayashi H, Hosaka T, Sugiyama Y, Suzuki T, Arai T, Kondo A, et al. Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women. Am J Reprod Immunol 2001:46:318–22.
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR. Transforming growth factor-beta activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. Obstet Gynecol 1994;83:287–92.
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997;67:817–21.
- Dias JA Jr, Oliveira RM, Podgaec S, Abrao MS. Endometriosis and immunology: is the dosage of the natural killer cells relevant? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2005;123(Suppl):S14–5.
- Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LFC, Baracat EC, Abrao MS. CD4+CD25highFoxp3+ cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. Am J Reprod Immunol 2012;68:301–8.
- Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killers cells. J Leukoc Biol 2002;71:173–83.
- Goncalves MO, Dias JA Jr, Podgaec S, Averbach M, Abrão MS. Transvaginal ultrasound for diagnosis of deeply infiltrating endometriosis. Int J Gynaecol Obstet 2009;104:156–60.
- Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, Tavmergen E, Zheng W, Arici A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. Fertil Steril 2009;91:687–93.
- Herington JL, Bruner-Tran KL, Lucas JA, Osteen KG. Immune interactions in endometriosis. Expert Rev Clin Immunol 2011;7:611–26.
- Fassbender A, Overbergh L, Verdrengh E, Kyama CM, Vodolazakaia A, Bokor A, et al. How can macroscopically normal peritoneum contribute to the pathogenesis of endometriosis? Fertil Steril 2011;96:697–9.
- 28. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade inata. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011:55–88.
- 29. Nishida M, Nasu K, Narahara H. Role of chemokines in the pathogenesis of endometriosis. Front Biosci 2011;3:1196–204.
- Basta P, Majka M, Jozwicki W, Lukaszewska E, Knafel A, Grabiec M, et al. The frequency of CD25+CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in ectopic endometrium and ectopic decidua. Reprod Biol Endocrinol 2010;8:116.
- 31. Berbic M, Fraser IS. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. J Reprod Immunol 2011;88:149–55.
- André GM, Barbosa CP, Teles JS, Vilarino FL, Christofolini DM, Bianco B. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis. Fertil Steril 2011;95:2223–7.
- Heiseke AF, Faul AC, Lehr HA, Förster I, Schmid RM, Krug AB, et al. CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cellmediated protection from colitis. Gastroenterology 2012;142:335–45.
- Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T celldependent colitis. Immunity 2008;28:559–70.
- 35. Park SG, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS, et al. T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing  $\gamma\delta$  T cells. Immunity 2010;33:791–803.
- Budiu RA, Diaconu I, Chrissluis R, Dricu A, Edwards RP, Vlad AM. A conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis shows the presence of anti-MUC1 antibodies and Foxp3+ regulatory T cells. Dis Model Mech 2009;2:593–603.
- Prieto GA. Progression of endometriosis to cancer: too MUCh FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cell response? Dis Model Mech 2011;4:139–40.

- 38. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytolysis. J Immunol 1995:155:3877–88
- Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, Thompson DA, et al. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3β receptor CCR7. J Cell Biol 1998;141:1053–9.
- Kim CH, Pelus LM, Appelbaum E, Johanson K, Anzai N, Broxmeyer HE. CCR7 ligands, SLC/6Ckine/Exodus2/TCA4 and CKβ-11/MIP-3β/ELC, are chemoattractants for CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> NK cells and late stage lymphoid progenitors. Cell Immunol 1999;193:226–35.
- Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A, Okazaki T, et al. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. J Immunol 2000;164: 4055–62.
- 42. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, et al. Unique subpopulations of CD56<sup>+</sup> NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. J Immunol 2001;166:6477–82.
- Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. Blood 2001;97: 367–75.
- 44. Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, et al. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR)  $\alpha\beta^+$  CD8+ single-positive

- T cells, TCR  $\gamma\delta^+$  T cells, and natural killer-type cells in human thymus. Blood 2001;97:601–7.
- Zhang Q, Shimoya K, Temma K, Kimura T, Tsujie T, Shioji M, et al. Expression of fractalkine in the fallopian tube and of CX3CR1 in sperm. Hum Reprod 2004;19:409–14.
- Shimoya K, Zhang Q, Temma-Asano K, Hayashi S, Kimura T, Murata Y. Fractalkine in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Int J Gynaecol Obstet 2005;91:36–41.
- Watanabe M, Shimoya K, Zhang Q, Temma-Asano K, Kimura T, Murata Y. The expression of fractalkine in the endometrium during the menstrual cycle. Int J Gynaecol Obstet 2006;92:242–7.
- Glace L, Grygielko ET, Boyle R, Wang Q, Laping NJ, Sulpizio AC, et al. Estrogen-induced stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/Cxcl12) expression is repressed by progesterone and by selective estrogen receptor modulators via estrogen receptor alpha in rat uterine cells and tissues. Steroids 2009; 74:1015–24.
- Furuya M, Suyama T, Usui H, Kasuya Y, Nishiyama M, Tanaka N, et al. Upregulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. Hum Pathol 2007;38:1676–87.
- Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? Gynecol Obstet Invest 2006:62:139–47.
- 51. Barrier BF. Immunology of endometriosis. Clin Obstet Gynecol 2010;53: 397–402.