FREDERICO JOSÉ SILVA CORRÊA

**Avaliação das células iNKT em
pacientes com endometriose**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Corrêa, Frederico José Silva

Avaliação das células iNKT em pacientes com
endometriose / Frederico José Silva Corrêa. -- São
Paulo, 2018.

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Maurício Simões Abrão.

Descritores: 1.Endometriose 2.Células T
matadoras naturais 3.Interleucinas 4.Citometria de
fluxo 5.Microscopia confocal 6.Dor pélvica

USP/FM/DBD-439/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais

Marcos e Nina

pelo exemplo de vida e de amor à família.

Meu eterno respeito e gratidão.

Aos meus amados irmãos

Bruno, Rafael e Izadora

Pela amizade, incentivo e companheirismo.

Aos meus filhos

João Victor, Geovanna e João Marcos,

criaturas maravilhosas que Deus me presenteou

e que são a razão da minha vida.

Agradecimentos

Ao **Professor Doutor Mauricio Simões Abrão**, obrigado pela confiança, incentivo, orientação e amizade. Exemplo de competência e dedicação. Serei sempre grato.

À **Professora Doutora Karina Inácio Carvalho** pelo apoio, orientação e amizade.

Ao **Professor Doutor Edmund Chada Baracat** pela oportunidade de realizar esse trabalho na pós graduação de Obstetrícia e Ginecologia da USP.

À **Ana Eduarda Z. Carvalho** pelo apoio na realização dos experimentos, confecção de figuras e pela amizade.

À **Maria Lucia Carnevale Marin** pelo apoio na coleta de material, armazenamento e realização de experimentos.

Aos Srs. **Marcus Vinicius de Nigro Corpa, Cristovao Luis P. Manguiera e Thiago Pinheiro Arrais Aloia** pelo apoio na realização de experimentos e pelas sugestões.

Ao **Professor Doutor Sérgio Podgaec** pela amizade, sugestões e contribuições.

Aos **Doutores Patrick Bellelis, João Antônio Dias Junior, Luiz Flávio Cordeiro Fernandes, Lidia Hyun Joo Myung** pelas contribuições e amizade.

Ao Doutor **Rômulo Medeiros de Almeida** pela amizade, apoio e incentivo.

Agradeço aos **pacientes** que participaram voluntariamente e sem as quais esse trabalho não seria possível.

Agradeço a **Deus** por ter me permitido realizar esse objetivo e por tudo que tem realizado na minha vida.

Normatização Adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	ix
Lista de figuras.....	xii
Lista de gráficos	xiii
Lista de quadros.....	xv
Lista de tabelas	xvi
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais sobre o sistema imunológico	6
1.2 Considerações sobre os sistemas imunológico e a endometriose ...	14
1.3 As células <i>Natural Killer</i>	17
1.4 Subtipos de células iNKT	22
1.5 Células iNKT e endometriose	26
2. OBJETIVOS.....	27
3. MÉTODOS.....	29
3.1 Critérios de inclusão e exclusão	31
3.2 Dinâmica do estudo	32
3.3 Quadro clínico.....	33
3.4 Estadiamento da endometriose	34
3.5 Locais da endometriose.....	36
3.6 Confirmação da endometriose	36
3.7 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico.....	37
3.7.1 Sangue heparinizado.....	37
3.8 Análise dos marcadores de células iNKT por citometria de fluxo	37
3.8.1 Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	37
3.8.2 Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico	38
3.8.3 Estimulação das células iNKT para medição de citocinas.....	44

3.8.4 Marcação por imunofluorescência na microscopia confocal..	45
3.9 Análise estatística	46
4. RESULTADOS	49
4.1 Dados demográficos e clínicos	49
4.2 Estadiamento da endometriose	52
4.3 Análise das frequências das células iNKT	53
4.4 Análise das frequências dos subtipos de células iNKT	55
4.5 Análise das frequências das células iNKT e subtipos em relação aos sintomas da endometriose.....	58
4.6 Análise das células iNKT e o estágio da endometriose	66
4.7 Avaliação das células iNKT nas lesões de endometriose.....	74
5. DISCUSSÃO.....	76
6. CONCLUSÕES.....	87
7. ANEXOS.....	90
8. REFERÊNCIAS	112

Listas

Abreviaturas

α -GalCer	α -galactosylceramida
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células Apresentadoras de Antígenos)
AR	Artrite reumatóide
ASRM	<i>American Society of Reproductive Medicine</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento de fibroblasto básico)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCR	Receptor de quimiocinas
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CIVD	<i>Common variable immunodeficiency</i> (imunodeficiência comum variável)
CLTs	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i> (Linfócitos T citotóxicos)
CXCR	<i>CXC chemokine receptor</i> (CXC receptor de quimiocinas)
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco modified eagle medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DN	Duplo negativo
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetraacético)
EVA	Escala visual analógica
FACSDiva	fluorescence-activated cell sorting Diva
FSC	<i>Forward-scattered light</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HE	Hematoxilina-Eozina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)

HTLV	<i>Human T-Cell Lymphotropic Virus</i> (Vírus linfotrófico da célula T humana)
IFN-gama	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-17R	Receptor de Interleucina 17
IL-1Ra	<i>IL-1 receptor antagonist</i> (antagonista do receptor da interleucina 1)
IMC	Índice de massa corporea
iNKT	<i>Invariant Natural Killer T</i> (Natural Killer T invariante)
IP	<i>interferon-inducible protein</i> (proteína 10 induzida por interferon)
LES	Lupus Eritematoso Sistemico
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
NK	<i>Natural Killer</i>
iNKT	<i>Natural Killer T</i>
NKG2D	Receptor de ativação das células NK
NKTDN	<i>Natural Killer T</i> duplo negativo (CD4- e CD8-)
NKTDN	<i>tural Killer T</i> duplo positivo (CD4+ e CD8+)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
SSC	<i>Side-scattered light</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor de Células T)
TGFβ	Transforming Growth Factor - β (Fator de Crescimento Transformante – β)
Th	<i>T helper</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - alpha (Fator de Necrose Tumoral – alfa)
Treg	Células T reguladoras

V α 24	Receptor de células iNKT
V β 11	Receptor de células iNKT
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Vascular endotelial)

Figuras

Figura 1 -	Classificação de endometriose da <i>American Society for Reproductive Medicine</i> , revisada em 1996	35
Figura 2 -	A - Endometriose profunda de retossigmoide aderida à região retrocervical. B - Endometriose profunda de região retrocervical, envolvendo os ligamentos útero-sacros bilaterais.....	36
Figura 3 -	Representação gráfica de Imunofenotipagem. <i>Density Plot</i> de citometria de fluxo de linfócitos (3a), seleção de gate para análise de viabilidade celular (3b), seleção de gate de linfócitos CD3 para CD4+ e CD8+ (3c) e células <i>natural Killer T</i> (iNKT) (3d).	41
Figura 4 -	Representação gráfica de Imunofenotipagem. <i>Density Plot</i> citometria de fluxo de linfócitos CD3 (4a), CD3+CCR7+ (4b) e CD3+CD25+ (4c). <i>Density Plot</i> de citometria de fluxo de linfócitos CD4+ e CD8+ (4d), seleção de gate de linfócitos CD8+CCR7+ (4e), CD8+CD25+ (4f) e linfócitos CD4+CCR7+ (4g) e CD4+CD25+ (4h).	42
Figura 5 -	Representação gráfica de Imunofenotipagem de células iNKT e seus sub-tipos (5b – 5h). <i>Density Plot</i> de citometria de fluxo de células iNKT com marcadores <i>Vbeta11</i> e <i>Valpha24</i> (5a), seleção de gate de células iNKT CD4+ e iNKT CD8+ (5b), seleção de gate de células iNKT CD8+ CCR7+ (5c) e iNKT CD8+ CD25+ (5d), seleção de gate de células iNKT DN CCR7+ (5e) e iNKT DN CD25+ (5f), seleção de gate de células iNKT CD4+CCR7+ (5g) e iNKT CD4+CD25+ (5h).	43
Figura 6 -	Imunocoloração confocal de células iNKT em lesões de endometriose. (A) Mesclagem representativa de células coradas marcadas com CD3 (vermelho), CD1D (verde), CD4 (amarelo) e DAPI (azul) de áreas saudáveis e áreas de endometriose. (B) Porcentagem de células iNKT em áreas saudáveis e endometriose do tecido (n = 9).	74

Gráficos

Gráfico 1 -	Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose.	54
Gráfico 2 -	Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sintomas clínicos de dismenorréia com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA.	59
Gráfico 3 -	Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e sintomas clínicos de dor pélvica acíclica com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA.	62
Gráfico 4 -	Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT CD4+ IL17+ no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e intensidade de sintoma de dor pélvica acíclica.	62
Gráfico 5 -	Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e sintomas clínicos de dispareunia com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA.	63
Gráfico 6 -	Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e sintomas clínicos de alteração intestinal cíclica com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA.	64
Gráfico 7 -	Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e sintomas clínicos de alteração urinária cíclica com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA.	65
Gráfico 8 -	Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo estágio I/II ou III/IV da doença nas pacientes com endometriose profunda.	67

Gráfico 9 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e grupo controle na fase secretora do ciclo menstrual.	72
Gráfico 10 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT e células CD3+ no tecido com lesão de endometriose e tecido normal sem lesão de endometriose.	75

Quadros

- Quadro 1 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT DN (**A**) e iNKT DN IL17+ (**B**) no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose..... 57
- Quadro 2 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT CD4+ CCR7+ (**A**) e iNKT CD4+ IL17+ (**B**) no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e intensidade de sintoma de dismenorréia. 60
- Quadro 3 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células (**A**) iNKT CD4+ CD25+ na fase proliferativa em pacientes com endometriose e grupo controle; (**B**) iNKT DN na fase proliferativa em pacientes com endometriose e grupo controle; (**C**) iNKT DN CD25+ em pacientes com endometriose profunda na fase proliferativa e secretora do ciclo menstrual; (**D**) iNKT DN IL17+ na fase secretora em pacientes com endometriose e grupo controle 73

Tabelas

Tabela 1 -	Intensidade de secreção de citocinas pelos subtipos de células iNKT CD4+, DN e CD8+ após estimulação. Adaptado de O'Reilly et al., 2011.....	24
Tabela 2 -	Avaliação de semelhança dos dados clínicos de idade, índice de massa corpórea e fase do ciclo menstrual entre as pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose.	49
Tabela 3 -	Avaliação de semelhança dos sintomas clínicos entre as pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose	51
Tabela 4 -	Avaliação de semelhança em relação ao estágio da endometriose entre as pacientes com endometriose profunda infiltrativa.....	52
Tabela 5 -	Descrição das médias das frequências das células iNKT no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e resultado da comparação entre os grupos.....	53
Tabela 6 -	Descrição das médias das frequências dos subtipos de células iNKT CD4+, DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e resultado da comparação entre os grupos. Resultados em média e desvio padrão.	55
Tabela 7 -	Descrição das médias das frequências dos subtipos de células iNKT secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e resultado da comparação entre os grupos. Resultados em média e desvio padrão.....	56
Tabela 8 -	Descrição das médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa (grupo endometriose) e sem endometriose (grupo controle) e a fase do ciclo menstrual. Resultado da comparação entre os grupos e entre as fases do ciclo menstrual.	70

Resumo

Corrêa FJS. *Avaliação das células iNKT em pacientes com endometriose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A endometriose é uma doença com características inflamatórias que atinge as mulheres em idade reprodutiva. A patogênese da endometriose não está esclarecida. Tem sido demonstrada associação entre distúrbios imunológicos e endometriose, como alterações nos macrófagos, células NK, citocinas e nas repostas Th1, Th2 e Th17. As células iNKT, um tipo especial de linfócitos T, tem importante papel na resposta inflamatória como mediadores das repostas Th1, Th2 e Th17. **Objetivos:** o objetivo principal deste estudo foi comparar as frequências das células iNKT e seus subtipos entre pacientes com endometriose e pacientes sem endometriose. Procuramos também comparar as frequências destas células em ambos os grupos relacionando com alguns os aspectos clínicos e cirúrgicos da doença. **Métodos:** Realizamos estudo transversal, prospectivo entre fevereiro de 2013 a fevereiro de 2015 que avaliou a porcentagem de células iNKT e os subtipos iNKT CD4+, iNKT CD4+ CCR7+, iNKT CD4+ CD25+, iNKT DN, iNKT DN CCR7+, iNKT DN CD25+, iNKT CD4+ IL6+, iNKT CD4+ IL10+, iNKT CD4+ IL17+, iNKT CD8+ IL6+, iNKT CD8+ IL10+, iNKT CD8+ IL17+, iNKT DN IL6+, iNKT DN IL10+, iNKT DN IL17+ no sangue periférico, por citometria de fluxo, em pacientes com endometriose profunda (n = 47) e sem endometriose (n = 26). As frequências de células iNKT e seus subtipos foram comparadas entre os grupos de acordo com os sintomas, fase do ciclo, estágio da doença e classificação histológica. **Resultados:** Na avaliação da frequência das células iNKT, iNKT DN e iNKT DN IL17+ foi evidenciada diminuição significativa nas pacientes com endometriose (p=0,010, p=0,020, p=0,050; respectivamente). Além disso, foi observada diminuição significativa nas frequências das células iNKT CD4+ CCR7+ e aumento significativo das células iNKT CD4+ IL-17+ em pacientes com endometriose e dismenorréia severa em comparação a dismenorréia ausente/leve. Nas pacientes com endometriose e dor acíclica severa observou-se diminuição significativa da frequência das células iNKT CD4+ IL17+ em comparação a dor acíclica ausente/leve (p=0,048). Houve diminuição das células iNKT nas pacientes com endometriose em relação ao grupo controle na fase secretora do ciclo menstrual (p=0,030). Na avaliação da fase do ciclo menstrual foi observado na fase proliferativa aumento significativo na frequência das células iNKT CD4+ CD25+ (p=0,022) e diminuição significativa das células iNKT DN (p=0,011) nas pacientes com endometriose. Na fase secretora foi evidenciado diminuição significativa na frequência das células iNKT DN IL17+ (p=0,049) nas pacientes com endometriose. Foi identificado também nas pacientes com endometriose uma diminuição na frequência das células iNKT DN CD25+ na fase

secretora em relação a fase proliferativa do ciclo menstrual. **Conclusões:** As células iNKT e os subtipos iNKT DN e iNKT DN IL17+ se mostraram alteradas nas pacientes com endometriose profunda. Subtipos específicos de células iNKT estão alteradas nas pacientes com endometriose profunda em pacientes com dismenorréia e dor acíclica severas. As fases do ciclo menstrual estão relacionadas a alteração nas frequências das células iNKT e dos subtipos iNKT CD4+ CD25+, iNKT DN, iNKT DN IL17+ e iNKT DN CD25+ nas pacientes com endometriose profunda. Estes resultados sugerem participação das células iNKT no desenvolvimento da endometriose.

Descritores: endometriose; células T matadoras naturais; interleucinas; citometria de fluxo; microscopia confocal; dor pélvica.

Abstract

Corrêa FJS. *Evaluation of iNKT cells in patients with endometriosis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: Endometriosis is a disease with inflammatory characteristics that affects women of reproductive age. The pathogenesis of endometriosis is unclear. There has been an association between immune disorders and endometriosis, such as changes in macrophages, NK cells, cytokines, and Th1, Th2 and Th17 responses. iNKT cells, a special type of T lymphocytes, play an important role in the inflammatory response as mediators of the Th1, Th2 and Th17 responses. **Objectives:** The main objective of this study was to compare the frequencies of iNKT cells and their subtypes between patients with endometriosis and patients without endometriosis. We also compare the frequencies of these cells in both groups relating to some clinical and surgical aspects of the disease. **Methods:** We performed a prospective cross-sectional study between February 2013 and February 2015, which evaluated the percentage of iNKT cells and iNKT CD4+, iNKT CD4+ CCR7+, iNKT CD4+ CD25+, iNKT DN, iNKT DN CCR7+, iNKT DN CD25+, iNKT CD4+ IL6+ , iNKT CD8+ IL17+, iNKT DN IL6+, iNKT DN IL10+, iNKT DN IL17+ in the peripheral blood, by flow cytometry, in patients with deep endometriosis (n = 47), iNKT CD4+ IL10+, iNKT CD4+ IL17+, iNKT CD8+) and without endometriosis (n = 26). The frequencies of iNKT cells and their subtypes were compared between groups according to symptoms, stage of the cycle, stage of the disease and histological classification. **Results:** iNKT, iNKT DN and iNKT DN IL17+ cells showed significant decrease in patients with endometriosis (p = 0.010, p = 0.020, p = 0.050, respectively). In addition, a significant decrease in iNKT CD4+ CCR7+ cell numbers and a significant increase of iNKT CD4+ IL17+ cells were observed in patients with endometriosis and severe dysmenorrhea compared to absent / mild dysmenorrhea. In patients with endometriosis and severe acyclic pain, there was a significant decrease in the frequency of iNKT CD4+ IL17+ cells compared to absent / mild acyclic pain (p = 0.048). There was a decrease in iNKT cells in patients with endometriosis compared to the control group in the secretory phase of the menstrual cycle (p = 0.030). In the menstrual cycle, a significant increase in iNKT CD4+ CD25+ cells (p = 0.022) and a significant decrease in iNKT DN cells (p = 0.011) was observed in the proliferative phase in patients with endometriosis. In the secretory phase there was a significant decrease in the frequency of iNKT DN IL17 + cells (p = 0.049) in patients with endometriosis. It was also identified in patients with endometriosis a decrease in the frequency of iNKT DN CD25+ cells in the secretory phase in relation to the proliferative phase of the menstrual cycle. **Conclusions:** iNKT cells and subtypes iNKT DN e iNKT DN IL17+ have been altered in patients with deep endometriosis. Specific subtypes of iNKT cells are altered in patients with deep endometriosis in patients with severe

dysmenorrhea and acyclic pain. The phases of the menstrual cycle are related to changes in the frequencies of iNKT cells and subtypes iNKT CD4+ CD25+, iNKT DN, iNKT DN IL17+ and iNKT DN CD25+ in patients with deep endometriosis. These results suggest the participation of iNKT cells in the development of endometriosis.

Descriptors: endometriosis; natural killer T-cells; interleukins; flow cytometry; microscopy, confocal; pelvic pain.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é caracterizada pela presença de glândulas endometriais e/ou estroma fora da cavidade uterina, que acomete, principalmente, mulheres no período reprodutivo (Giudice; Kao, 2004). Carl Von Rokitansky, em 1860, descreveu, pela primeira vez focos de endométrio ectópico em peças de autópsia, caracterizando a endometriose. Entretanto, estudos históricos relatam sintomas sugestivos da doença encontrados em mulheres há mais de dois mil anos (Nezhat et al., 2012). Estima-se que 10% a 15% das mulheres no período reprodutivo tenham endometriose, mas esta pode ser encontrada em 2 a 4% das mulheres após a menopausa (Strathy et al., 1982; Moen, 1991). A doença tem impacto severo em relação ao bem-estar geral, físico, mental e social das mulheres acometidas (Damario; Rock, 1995; Ferrero et al., 2005; Luisi et al., 2009; Bassi et al., 2011).

Dismenorréia, dispareunia profunda, dor pélvica crônica, sangramento anormal e infertilidade são os principais sintomas associados à endometriose (Kennedy et al., 2005). Sintomas intestinais como disquezia, hematoquezia, obstipação, tenesmo, distensão abdominal e sintomas urinários como polaciúria, dor ao urinar e hematúria, também, podem ocorrer dependendo da localização das lesões nesses órgãos (Abrao et al., 1994; Kennedy et al., 2005; Giudice, 2010). Os primeiros sintomas da endometriose manifestam-se na adolescência antes dos 15 anos em 38%, e, antes dos 20 anos em, aproximadamente, 66% das mulheres acometidas

(Ballweg, 2003). O início precoce dos sintomas e a pouca importância dada ao sintoma de dismenorréia pelos profissionais de saúde e pela própria paciente contribuem para longo tempo entre o início do quadro clínico e o diagnóstico da doença. Arruda et al. (2003) demonstraram que o tempo para o diagnóstico da endometriose desde o início dos sintomas é de 7 anos e 12,1 anos, em média, quando os sintomas iniciaram antes dos 19 anos de idade. A falta de um exame não invasivo, factível e com boa acurácia é um dos fatores que contribuem para o retardo no diagnóstico (Arruda et al., 2003; Ballard et al., 2006; Garry, 2006; Nnoaham et al., 2011; Riazi et al., 2015).

As lesões de endometriose se apresentam de formas e localizações variadas, o que dificulta a sua padronização e classificação. A doença pode ser dividida em profunda ou superficial quando apresenta mais ou menos de cinco milímetros de diâmetro, respectivamente, de acordo com a definição de Cornillie (Cornillie et al., 1990). Em 1997, com objetivo de facilitar a padronização da doença, Nisolle e Donnez propuseram uma classificação da endometriose em três tipos: a endometriose peritoneal, a endometriose ovariana e a endometriose do septo retovaginal. A doença peritoneal foi caracterizada pela presença de lesões superficiais no peritônio; a doença ovariana foi descrita pela presença de endometriose superficial ou os cistos de endometriose conhecidos como endometrioma; e a doença do septo retovaginal, foi caracterizada por lesões que acometeriam as regiões retrocervical, paracervical, o septo retovaginal, o retossigmoide, os ureteres e a bexiga de forma infiltrativa e profunda com lesões maiores do que cinco

milímetros em profundidade (Nisolle; Donnez, 1997). Várias classificações para endometriose já foram propostas por diversos autores (ASRM, 1997; Adamson, 2011; Haas et al., 2013). A classificação proposta pela associação americana de medicina reprodutiva (ASRM), revisada em 1996, mais amplamente utilizada nos estudos sobre endometriose propõe a divisão da doença em quatro estádios (estádio I – mínima, estágio II – leve, estágio III – moderada e estágio IV – severa) de acordo com os achados cirúrgicos (ASRM, 1997). Essa classificação foi desenvolvida, principalmente, para avaliar o impacto na fertilidade da mulher, mas sua correlação com a intensidade de dor é fraca (Canis et al., 1993; ASRM, 1997; Vercellini et al., 2007).

Em função da diversidade de sinais, sintomas e variedade de lesões que envolvem a doença, diagnóstico clínico da endometriose é difícil e incerto. Pesquisas sobre o diagnóstico da endometriose são realizadas comparando-se as manifestações clínicas, as técnicas de imagem, marcadores biológicos e as técnicas cirúrgicas (Scarselli et al., 2005; Riazi et al., 2015). Entretanto, a laparoscopia com visualização das lesões e confirmação histológica da presença de glândulas e estroma endometriais ainda é o método de escolha para o diagnóstico de endometriose (Nnoaham et al., 2012; Fassbender et al., 2015). O quadro clínico é importante em relação à definição de quais pacientes devem ser submetidas a uma investigação mais profunda e específica para endometriose. No exame físico, o toque vaginal bimanual apresenta acurácia de 63% e 55% no diagnóstico da endometriose de reto-sigmoide e retrocervical,

respectivamente (Abrao et al., 2007). Os diversos tipos de marcadores investigados para o diagnóstico da endometriose avaliados isoladamente ou em painéis apresentam baixa acurácia e não tem aplicação clínica (May et al., 2010). A ressonância nuclear magnética e a ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal tem excelente acurácia e aplicação clínica no diagnóstico das lesões de endometriose infiltrativa profunda e dos endometriomas ovarianos (Abrao et al., 2007; Bazot; Darai, 2008; Gonçalves et al., 2009). A ultrassonografia transvaginal é o exame de imagem que apresenta a melhor relação custo-benefício na endometriose profunda e ovariana e, portanto, a primeira escolha no diagnóstico da doença (Abrao et al., 2009; Gonçalves et al., 2010).

Apesar de a doença ter sido descrita há mais de um século e meio, a patogênese da endometriose, ainda, não foi esclarecida. Várias teorias foram propostas para explicar o desenvolvimento da doença. A principal hipótese da patogênese da endometriose baseia-se em algumas teorias, dentre as quais é possível destacar duas de maior relevância: a teoria da metaplasia celômica e a teoria da menstruação retrógrada. Uma das teorias mais antigas, a da metaplasia, proposta por Meyer em 1919, sugere que, sob diversas influências, o tecido celômico poderia se transformar em endométrio (Vinatier et al., 2001; Vercellini et al., 2014). A teoria mais citada na literatura, proposta por Sampson em 1927, propõe que o fenômeno fisiológico do refluxo de endométrio pelas trompas uterinas durante a menstruação poderia, em certas condições, sobrepor aos mecanismos de defesa locais, implantar e proliferar (Sampson, 1927). As razões para a

ocorrência da endometriose são provavelmente numerosas e envolvem o endométrio, o sistema imunológico, o peritônio e as tubas uterinas (Vinatier et al., 2001).

1.1 Considerações gerais sobre o sistema imunológico

Existem, fundamentalmente, dois tipos de resposta imune com características diferentes, a inata e a adquirida (Delves; Roitt, 2000a; Yatim; Lakkis, 2015).

A resposta imune inata proporciona a primeira linha de defesa contra microrganismos. Os principais componentes utilizados na resposta imune inata são as barreiras físicas e químicas como o epitélio e as substâncias produzidas na sua superfície; as células fagocíticas como os neutrófilos, monócitos e macrófagos; as células que liberam mediadores inflamatórios como os basófilos, mastócitos e eosinófilos; e as células *NK* responsáveis pela destruição dos microrganismos (Flajnik; Kasahara, 2010; Beaulieu et al., 2015). Os componentes moleculares da resposta imune inata incluem o complemento, proteínas de fase aguda e citocinas (Delves; Roitt, 2000a).

A resposta imune adquirida é um modelo de resposta mais elaborada que envolve a proliferação de linfócitos B e T que ocorre quando os receptores de superfície dessas células se ligam aos antígenos estranhos ao organismo (Delves; Roitt, 2000b). Uma característica desse tipo de resposta imunológica é o mecanismo de memória imunológica e a sua capacidade de melhorar a resposta após exposições repetidas ao antígeno. As células B

secretam imunoglobulinas, os anticorpos antígeno-específicos responsáveis pela eliminação dos microrganismos extracelulares. Os linfócitos T auxiliam os linfócitos B a produzir anticorpos e podem erradicar patógenos intracelulares ativando os macrófagos e matando as células infectadas (Delves; Roitt, 2000b; Silverstein, 2003; Balenga; Rafati, 2007; Litman et al., 2010).

Os linfócitos humanos podem ser divididos em três categorias principais baseados em suas funções biológicas e presença de determinados antígenos de superfície, os Linfócitos B, os Linfócitos T e as células *NK* (Brandtzaeg, 1996; Abbas, 2012). Os linfócitos apresentam em sua membrana celular, proteínas que são utilizadas como marcadores fenotípicos na distinção funcional das diferentes populações de linfócitos, denominados *Cluster of Differentiation* (CD) (Zola, 2001; Abbas, 2012).

Os linfócitos B são os responsáveis pela resposta imune humoral por meio da produção de anticorpos, que são proteínas (imunoglobulinas) divididas em cinco classes, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE de acordo com a sequência de aminoácidos na região constante da cadeia pesada (Ramanarayanan, 1985; Delves; Roitt, 2000a; Abbas, 2012).

Os linfócitos T são células relacionadas a imunidade celular, com capacidade de reconhecer antígenos de microrganismos intracelulares e destruí-los ou às células infectadas. Esses linfócitos possuem, em sua membrana, moléculas que atuam como receptores de antígenos distintas dos anticorpos. As células T apresentam uma especificidade no reconhecimento dos antígenos. Apenas antígenos, ligados a proteínas do

hospedeiro codificadas pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) e que se expressam na superfície de outras células, são reconhecidos pelos linfócitos T (Borrego et al., 2002; Goldberg; Rizzo, 2015a, Goldberg; Rizzo, 2015b). De acordo com as suas funções, os linfócitos T são divididos em subpopulações, sendo as populações mais bem caracterizadas as células T *Helper* (Th) ou auxiliares e os linfócitos T citolíticos ou citotóxicos (CLTs). Após estimulação antigênica, as células Th secretam citocinas que têm a função de estimular a proliferação e diferenciação das células T, a ativação de células B, dos macrófagos e de outros leucócitos. Os linfócitos Th, em relação aos antígenos de superfície, são CD3+CD4+CD8-, sendo, assim, identificados fenotipicamente (Onoe et al., 2007). Os CLTs são responsáveis por destruir as células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares que produzem antígenos estranhos. Esses linfócitos são identificados pelos antígenos de superfície CD3+CD4-CD8+. Alguns linfócitos T têm como função principal inibir as respostas imunológicas e são chamadas de células T reguladoras (Treg) (Delves; Roitt, 2000a; Delves; Roitt, 2000b; Langier et al., 2010; Abbas, 2012; Benoist; Mathis, 2012; Barbi et al., 2013; Rothstein; Camirand, 2015)

A terceira classe de linfócitos são as células *NK* que constituem 5% a 20% das células mononucleares no sangue e no baço, mas são raras nos órgãos linfoides (Barao; Ascensao, 1998). As células *NK* são derivadas de precursores da medula óssea, mostram-se como linfócitos grandes com grânulos citoplasmáticos numerosos e com antígenos de superfície CD3-

CD56+CD16+ (Moretta et al., 2002a, Moretta et al., 2002b; Caligiuri, 2008). Entretanto, em função da diferença de fenótipos de superfície e linhagem celular, essas células não constituem linfócitos T, tampouco linfócitos B, além de não expressarem receptores antigênicos semelhantes às células T e B. As células *NK* reconhecem as células infectadas destruindo-as diretamente e secretando citocinas inflamatórias. Esses linfócitos *NK* são, ainda, uma fonte importante de Interferon gama (IFN-gama) que ativa os macrófagos para destruir os microrganismos fagocitados (Moretta et al., 2002a, Moretta et al., 2002b; Caligiuri, 2008). As principais citocinas do sistema imune inato que estimulam as funções das células *NK* são as IL-12, IL-15, IL-18 e o IFN-gama. Essas citocinas aumentam a atividade citotóxica das células *NK* e a quantidade de IFN-gama secretada por estas (Delves; Roitt, 2000a; Delves; Roitt, 2000b; Sinkovics; Horvath, 2005; Abbas, 2012).

A resposta imune inata, além de fornecer a primeira defesa contra microrganismos, também, inicia a resposta imune adaptativa por meio de sinais que induzem em associação com o antígeno a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e B com especificidade aos antígenos. O sistema imune adaptativo utiliza três estratégias principais para combater a maioria dos microrganismos: o reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos; a imunidade celular com ativação dos linfócitos T e eliminação dos microrganismos intracelulares e a imunidade humoral com ativação dos linfócitos B e eliminação dos microrganismos extracelulares (Delves; Roitt, 2000a; Delves; Roitt, 2000b; Abbas, 2012). Os antígenos são apresentados aos linfócitos pelas células apresentadoras de antígenos (APC – do inglês –

antigen presenting cells). As células dendríticas são as APCs mais especializadas com função de capturar os antígenos microbianos e os transportar até os órgãos linfoides e apresentá-los aos linfócitos T. Os linfócitos ativados pelos antígenos desencadeiam vários mecanismos com a função de eliminá-los. Os linfócitos Th ativados se transformam em células efetoras cujas funções são mediadas em grande parte pelas citocinas secretadas (Delves; Roitt, 2000a; Delves; Roitt, 2000b; Abbas, 2012). Uma delas é a interleucina 2 (IL-2), que atua como fator de crescimento sobre os linfócitos Th CD4+ ativados por antígenos e estimula a sua proliferação em forma de expansão clonal. Esses linfócitos efetores deixam os órgãos linfoides e migram para os locais de infecção e inflamação. Outras células Th CD4+ efetoras secretam citocinas que recrutam leucócitos e que estimulam a produção de substâncias microbicidas nos fagócitos ajudando-os a destruir os microrganismos. Os linfócitos CD8+ ativados diferenciam-se em CLTs que destroem as células com microrganismos no citoplasma e eliminam os reservatórios da infecção. Os linfócitos B ativados proliferam e diferenciam-se em células secretoras de anticorpos (Abbas, 2012).

Para a adequada resposta os linfócitos B aos antígenos proteicos, há necessidade de sinais ativadores dos linfócitos Th CD4+. Uma parcela das células B diferenciam-se em plasmócitos secretores de anticorpos. Os anticorpos se ligam a microrganismos e os impedem de infectar outras células do organismo ou colonizar os tecidos. A imunoglobulina G (IgG) recobre os microrganismos e os transformam em alvos para a fagocitose por neutrófilos e macrófagos. Paralelamente, as imunoglobulinas G e M (IgG e

IgM) ativam o sistema complemento cujos produtos promovem a fagocitose ou a destruição direta dos microrganismos (Abbas, 2012).

Existe uma classificação de células T CD4⁺ de acordo com suas características funcionais como o tipo de citocinas que elas produzem (Forsthuber; Ji, 2007; Abbas, 2012). Três tipos principais de células T CD4⁺, ou seja, Th1, Th2 e Th17, funcionam na defesa do hospedeiro contra diferentes tipos de microrganismos e estão envolvidos em tipos diferentes de lesão ao tecido nas patologias imunomediadas (Mosmann, 1989; Forsthuber; Ji, 2007; Abbas, 2012). Essas células se diferenciam a partir de células T virgens em resposta a determinadas citocinas presentes no início das respostas imunes. Da mesma forma, as células Th1, Th2 e Th17 expressam diferentes proteínas de superfície que determina fenótipo diverso entre elas (Abbas, 2012). Vários estudos têm demonstrado que a resposta anormal com a perda do equilíbrio entre as respostas Th1, Th2 e Th17 pode estar associada a uma variedade de doenças como o lúpus eritematoso, o mieloma múltiplo, a dermatite atópica, a pré-eclâmpsia, a osteoporose, a uveíte, a artrite reumatóide, a asma e a endometriose (Serrano Hernandez, 2009; Andreoli et al., 2011; Santodomingo-Garzon; Swain, 2011; Dolff et al., 2011; Shi et al., 2011; Campanati et al., 2014; Zhang et al., 2014; Batista et al., 2015; Feng et al., 2015; Talaat et al., 2015; Vargas-Rojas et al., 2015).

As células Th1 se diferenciam induzidas, principalmente, pelas citocinas IL-12 e IFN-gama em resposta a microrganismos que ativam as células dendríticas, macrófagos e células *NK*. Os principais microrganismos cujos antígenos estimulam essa diferenciação são as bactérias

intracelulares, as micobactérias e alguns parasitas capazes de infectar células dendríticas e macrófagos. Essas células desenvolvidas secretam IFN-gama que amplifica o padrão induzido ao promover mais diferenciação em Th1. O IFN-gama, ainda, pode inibir a diferenciação de células T virgens nos subtipos Th2 e Th17, promovendo, então, a polarização de resposta imune em uma direção. A principal citocina produzida pelas células Th1 efetoras é o IFN-gama que participa da resposta imune por meio de um conjunto de ações como a ativação dos macrófagos que culmina na destruição por estes, dos microrganismos fagocitados. Outras citocinas produzidas pelas células Th1 são o fator de necrose tumoral (TNF do inglês – *tumor necrosis factor*) e a IL-10. O TNF e as diversas quimiocinas produzidas pelas células Th1 contribuem para o recrutamento de leucócitos e aumento da inflamação. A IL-10 atua, principalmente, inibindo as células dendríticas e os macrófagos suprimindo, portanto, a resposta Th1, caracterizando uma resposta com feedback negativo (Abbas, 2012; Ahn et al., 2015; Kralickova; Vetvicka, 2015). As células Th1 têm importante atuação imunológica nas doenças autoimunes e dano ao tecido associado a infecções crônicas.

As células Th2, por sua vez, se diferenciam pelo estímulo da citocina IL-4 em resposta aos antígenos do helmintos e de alergenicos, que causam estimulação crônica das células T. Essas células respondem ao estímulo crônico e persistente por patógenos e antígenos com pouca inflamação e pouca produção de citocinas pró-inflamatórias, diferentemente das respostas Th1 e Th17 em que há muita inflamação (Abbas, 2012). As células Th2

expressam, em sua superfície, os genes das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 produz um feedback positivo em relação às células Th2, aumentando sua diferenciação, amplificando sua reação. Além disso a produção dessa citocina tem a função de inibir o desenvolvimento das células e respostas Th1 e Th17. Essa citocina é o maior estímulo à produção de anticorpos IgE pelas células Th2. A IgE é muito importante na resposta imune mediada por eosinófilos contra infecções por helmintos, além de mediar as reações de hipersensibilidade como as alergias (Damsker et al., 2010; Abbas, 2012). A IL-13 tem ação semelhante à da IL-4 com produção de efeitos biológicos associados à inflamação alérgica e à defesa contra helmintos. A associação da IL-13 com a IL-4 induz à ativação dos macrófagos alternativos que contribuem para a reparação de tecidos e fibrose. A IL-5 tem como principais ações ativar os eosinófilos maduros e estimular o crescimento e diferenciação de eosinófilos. Essa citocina, ainda, serve como ligação principal entre a ativação das células T e a inflamação por eosinófilos (Abbas, 2012).

Nos últimos anos, houve grande interesse em relação a estudos sobre as células Th17, descobertas há menos tempo que as Th1 e Th2 (Forsthuber; Ji, 2007; Andreoli et al., 2011). As principais citocinas produzidas pelos linfócitos Th17 são a IL-17, IL-22 e a IL-21. As células Th17 efectoras têm papel de induzir a inflamação por neutrófilos para destruir bactérias e fungos extracelulares. Além disso, estudos demonstraram a importância dessas células para a patogênese de doenças inflamatórias como a psoríase, artrite reumatoide, esclerose múltipla entre outras (Boissier

et al., 2008; Hedegaard et al., 2008; Meloni et al., 2009; Quaglino et al., 2011; Ekman et al., 2013; Campanati et al., 2014, ; Javadian et al., 2014; Xia et al., 2015). A IL-17 tem atuação como importante ligação entre o sistema imune adaptativo mediado pelas células T e o sistema imune inato por meio do seu componente inflamatório; como indutoras de reações inflamatórias ricas em neutrófilos e como estimuladora da produção de substâncias antimicrobianas. A IL-22 contribui para a inflamação local e para lesão tecidual, e a IL-21 tem uma grande variação de afeitos nas células B, T e NK com importante função em relação às respostas dos anticorpos e a proliferação de células T CD8+ e das células NK (Abbas, 2012).

1.2 Considerações sobre os sistemas imunológico e a endometriose

Estudos revelam que o sistema imunológico está associado à patogênese da endometriose e que a falta de uma imunovigilância no peritônio é considerada fator causal comum dessa doença. Distúrbios na homeostase imunológica podem facilitar a implantação, proliferação e angiogênese do tecido endometrial (Oral; Arici, 1997; Matarese et al., 2003; Christodoulakos et al., 2007).

A interação de moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e as angiopoetinas é responsável pela regulação da angiogênese. Uma variedade de citocinas tais como IL-1, IL-6 e IL-8 estimulam a expressão do VEGF nas células endometriais (Ahn et al., 2015). O estradiol tem um papel importante para a estimulação da expressão de

VEGF nas células endometriais (Shifren et al., 1996). Vários estudos demonstraram a associação de níveis elevados de VEGF e endometriose. Níveis maiores de VEGF no fluido peritoneal foram encontrados em mulheres com endometriose avançada comparados com mulheres com endometriose leve ou saudáveis (McLaren et al., 1996b). Foi observado, também, uma associação direta entre elevados níveis de VEGF no plasma e no fluido peritoneal com aumento da atividade proliferativa e densidade de micro-vasos nas lesões de endometriose (Bourlev et al., 2006). Alguns estudos demonstraram que macrófagos peritoneais ativados e neutrófilos, também, são capazes de produzir e secretar VEGF (McLaren et al., 1996a; Mueller et al., 2000; Gargett; Masuda, 2010). Com base nessas observações, pode-se concluir que alterações imunológicas de fatores e citocinas que estimulam a angiogênese no ambiente peritoneal tem relação direta com o desenvolvimento da endometriose.

A endometriose está associada a uma redistribuição da população de linfócitos e da citotoxicidade das células *Natural Killer* (NK) e Th1, induzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do tipo Th2 (Nap et al., 2004; Agic et al., 2006; Martinez et al., 2007). Pacientes com endometriose têm maior efeito imunossupressor sobre a citotoxicidade das células NK, levando à diminuição da atividade citotóxica podendo permitir o desenvolvimento de fragmentos de endométrio em lesões endometriais ectópicas (Ho et al., 1995; Somigliana et al., 1996). Alterações no número de células dendríticas estão relacionadas à endometriose. Dois estudos mostraram resultados divergentes e opostos sobre o efeito da depleção de

células dendríticas na endometriose. O primeiro observou aumento das lesões de endometriose (Stanic et al., 2014) e o segundo uma atenuação das lesões de endometriose relacionados à depleção do número de células dendríticas (Pencovich et al., 2014).

As citocinas têm um papel essencial na resposta imune normal contra patógenos ou injúrias. Vários autores já demonstraram que a desregulação no número e na função das citocinas tem sido associado à presença ou desenvolvimento da endometriose (Monsanto et al., 2016).

Outros autores já demonstraram níveis aumentados de citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α em mulheres com endometriose (Gilmore et al., 1992; Arici et al., 1996; Tseng et al., 1996; Harada et al., 1997; Antsiferova et al., 2005; Gmyrek et al., 2005; Kalu et al., 2007; Gmyrek et al., 2008; Osuga et al., 2011; Lambert et al., 2014 ; Malutan et al., 2015; Monsanto et al., 2016).

Podgaec et al. identificaram um perfil predominante de citocinas séricas e do fluido peritoneal associado com respostas Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-2) e Th2 (IL-4, IL-10) em pacientes com endometriose. Os resultados sugerem que a endometriose é uma doença que envolve um comportamento inflamatório complexo com um claro componente Th2, apesar do aumento dos níveis de IFN- γ (Podgaec et al., 2007). Em um estudo similar, Fairbanks et al. (2009) avaliaram os níveis de IL-12 e IL-18 e compararam com o estágio, o local da doença e sua classificação histológica. Embora não existam diferenças em relação aos padrões de resposta imune Th1/Th2 e o local das lesões, sintomas clínicos específicos podem estar associados a

uma maior produção de citocinas específicas, com padrão de resposta imune Th1 e, também, à endometriose profunda (Fairbanks et al., 2009; Podgaec et al., 2010).

1.3 As células *Natural Killer T*

Nos últimos anos, as pesquisas sobre o papel das células T *Natural Killer* (*Natural Killer T* - *NKT*) têm revelado a sua importância em relação ao controle da resposta imune Th1 e Th2 e sua possível relação com algumas doenças (Au-Yeung; Fowell, 2007). As células NKT são uma subclasse de linfócitos T que expressam o receptor de células T (TCR) α/β com um repertório restrito (Godfrey et al., 2000; Godfrey et al., 2005, Godfrey et al., 2010). Essas células, também, expressam uma gama muito mais limitada da região de genes de TCR variável. Em ratos, o mais expresso é um rearranjo de cadeia β TCR invariante ($V\alpha14-J\alpha18$), com região CDR3 conservada e com coexpressão de $V\alpha8.2$, $V\beta2$ ou $V\beta7$. Células T similares estão presentes em humanos e outras espécies de mamíferos. Em humanos, a população homóloga de células NKT expressam um rearranjo de TCR cadeia β ($V\alpha24-J\alpha18$) contendo uma cadeia α ($V\beta11$). Essas células são extremamente conservadas na evolução, de forma que células NKT de ratos reconhecem o CD1d humano ligado a antígeno glicolipídico e vice-versa, fato que sugere a importância dessas células em pontos críticos e únicos do sistema imune (Dellabona et al., 1994; Brossay et al., 1998; Godfrey et al., 2004b). As células NKT compartilham as propriedades das células T e das

células *Natural Killer* (NK), e constituem cerca de 0,2% de todas as células T do sangue periférico (Godfrey et al., 2000; Macho-Fernandez; Brigl, 2015).

Contrariamente aos linfócitos T e T reguladores, o TCR da célula NKT não interage com antígenos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e classe II. Essas células NKT reconhecem, apenas, glicolípídeos apresentados pelo CD1d, uma molécula apresentadora de antígenos não clássica que se associa à microglobulina $\beta 2$ (Kronenberg; Gapin, 2002; Godfrey; Kronenberg, 2004a). A expressão CD1d ocorre em queratinócitos epidermais na pele, e em várias outras células periféricas epiteliais ou estromais em diversos órgãos como intestino grosso, intestino delgado, estômago, esôfago, vesícula biliar, fígado, rim, pâncreas, conjuntiva, testículo e epidídimo, mama, pele e útero (Canchis et al., 1993; Sieling, 2000; Fischelevich et al., 2006). Canchis et al. demonstraram, por imunoistoquímica, a presença de moléculas CD1d tanto no epitélio quanto em células estromais no tecido endometrial (Canchis et al., 1993). A expressão da molécula CD1d ao nível celular ocorre em células dendríticas, timócitos, células B, monócitos, macrófagos, células epiteliais e estromais (Balato et al., 2012).

As células NKT respondem de forma diferente à produção de citocinas da resposta imune Th1 e Th2 ou citocinas regulatórias, de acordo com o glicoesfingolípídeo apresentado (Balato et al., 2009; Godfrey; Kronenberg, 2004). Em virtude de reconhecerem, especificamente, apenas, antígenos glicolípídicos em associação ao CD1d, as células NKT reconhecem classes de antígenos ignorados pelas células T convencionais.

O composto mais eficiente em relação à ativação da maioria das células NKT é um glicolípido sintético (derivado da esponja marinha) conhecido como β -galactosylceramida (α -GalCer) (Sidobre et al., 2002; Hayakawa et al., 2004). O complexo formado pela α -GalCer e o CD1d se liga ao receptor TCR das células NKT e desencadeia a resposta destas. Outros antígenos glicolipídicos como o gangliosídeo GD3, o glicofosfatidilinositol, a fosfoetanolamina e outras formas de α -GalCer foram testados em sua capacidade de estimular as células NKT (Godfrey; Kronenberg, 2004). As células NKT são classificadas em dois tipos principais de células, as NKT tipo I e tipo II. As células NKT tipo I, também conhecidas como células NKT clássicas, NKT $V\beta 14$ invariante ($V\alpha 14I$), ou células NKT invariantes (iNKT), são as mais estudadas e caracterizadas pelo seu receptor TCR e pelo reconhecimento do complexo CD1d + α -GalCer que induz a resposta rápida dessas células. As células NKT tipo II ou não clássicas diferem-se das células clássicas por apresentarem um TCR com repertório diverso e por não reconhecerem o antígeno α -GalCer. Existe, ainda, um grupo heterogêneo de células “NKT-similares” que não são CD1d restritas (Godfrey; Kronenberg, 2004; Boyson et al., 2008).

As células iNKT, rapidamente, secretarem grandes quantidades tanto citocinas Th1 incluindo IFN- α e TNF quanto Th2 incluindo IL-4, IL-10 e IL-13, após estimulação do seu receptor TCR (Taniguchi et al., 2003; Kronenberg, 2005; Au-Yeung; Fowell, 2007; Bendelac et al., 2007). Michel et al., em 2007, identificaram a produção de IL-17 por células iNKT estimuladas por antígenos diversos (Michel et al., 2007). Em 2008, Niemeyer et al., em um

estudo de avaliação do perfil de expressão gênica das células iNKT identificaram aumento em relação à expressão dos genes da IL-17 e do receptor IL-17R. A descoberta desses autores caracteriza uma ampliação no espectro de ação destas células que incluem resposta Th1, Th2 e Th17. Além disso, as células iNKT têm a característica importante de servir como ligação entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. Isto se deve à capacidade destas células de induzirem a ativação de subtipos de leucócitos como as células B, as células dendríticas e as células NK (Bezbradica et al., 2005).

Estudos têm demonstrado a capacidade das células iNKT em mediar as funções imunes tanto protetoras quanto regulatórias, tais como rejeição tumoral, proteção contra microrganismos infecciosos, manutenção da tolerância aos transplantes e inibição do desenvolvimento das doenças autoimunes (Taniguchi et al., 2003). Apesar da capacidade de estimular a liberação de citocinas do tipo Th1 e Th2 simultaneamente, a ativação das células iNKT pode polarizar a resposta autoimune em direção ao perfil Th1 em alguns casos e Th2 em outras condições (Godfrey; Kronenberg, 2004; Balato et al., 2009).

Outros estudos demonstraram que defeitos seletivos no número de células iNKT e da produção de citocinas estão presentes em indivíduos afetados por diferentes doenças, tais como diabetes tipo I, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, cirrose biliar primária, asma alérgica, esclerose múltipla, infecção pelo vírus imunodeficiência humana-1 e tuberculose pulmonar (Yanagihara et al., 1999; Oishi et al., 2001; van der

Vliet et al., 2002; Chan et al., 2003; Lin et al., 2005; Snyder-Cappione et al., 2007; Fletcher; Baxter, 2009). Carvalho et al. demonstraram uma diminuição no número absoluto de células iNKT em pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID) comparados ao grupo controle (Carvalho et al., 2010).

A função e a atividade de diferentes tipos de células imunológicas que medeiam a imunossupressão ou imunoregulação direcionam os resultados da resposta imune na saúde e doença. Esses tipos celulares incluem as células T regulatórias (Treg), as células supressoras derivadas da medula e as células iNKT. As células iNKT tipo I e tipo II têm importante papel em relação à indução ou prevenção de doenças autoimunes, inflamação e câncer (Kumar; Delovitch, 2014). Os efeitos patogênicos e protetores das células iNKT e seus subtipos, após a estimulação agonista *in vivo* são determinados, principalmente, pelo momento da ativação, pela estrutura de antígenos lipídicos reconhecido, pela interação com diferentes células dendríticas e pelo perfil de secreção de citocinas. Estudos recentes mostraram que tipos distintos de CD1d ligados às células dendríticas podem regular diferentes perfis de citocinas secretadas pelas células iNKT, tipo Th1 (IL-12, IFN γ), tipo Th2 (IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, fator estimulador de colônias granulócitos – macrófagos) ou Th17 (IL-17A, IL-21 e IL-22) *in vivo* (Kumar; Delovitch, 2014; Lindau et al., 2013; Viale et al., 2012). Outras citocinas secretadas pelas células iNKT incluem IL-2, IL-5, IL-6, TNF α e TGF β . Portanto, dependendo do tipo de interação entre os subtipos de células iNKT, células dendríticas e citocinas secretadas pelas células iNKT ativadas

podem ativar ou suprimir a resposta imune adaptativa (Kumar; Delovitch, 2014).

1.4 Subtipos de células iNKT

As células iNKT podem ser divididas de acordo com os marcadores de superfície expressos e de forma ampla em subtipos CD4⁺ ou CD4⁻ e CD8⁺ ou CD8⁻. Portanto, os subtipos de células iNKT podem ser definidos como CD4⁺, CD4⁻CD8⁻ ou duplo negativo (DN) e CD8⁺. Em 1999 um estudo demonstrou fenótipo, função e desenvolvimentos heterogêneo nos distintos subtipos de células iNKT e que estas estão distribuídas, diferentemente, em um padrão tecido-específico (Hammond et al., 1999). Diferenças subtipo-específicas na expressão de marcadores de superfície foram descritas com iNKT CD4⁺ exibindo baixa expressão de CCR5 mas expressão aumentada de CCR4 em relação a iNKT CD4⁻. Estas, por sua vez, expressam CCR1, CCR6, CXCR6 e NKG2D mas todas as iNKT expressam altos níveis de CXCR3 e CXCR4. O subtipo CD4⁻ expressa baixos níveis de CD62L e altos níveis de CD11a, sugerindo fenótipo tecidual infiltrativo enquanto o subtipo CD4⁺ expressa, preferencialmente, CD62L exibindo um fenótipo direcionado a linfonodos (Kim et al., 2002; Juno et al., 2012).

A identificação dessas subpopulações pode explicar o comportamento biológico paradoxal das células iNKT que, ao produzirem rapidamente grandes quantidades de citocinas Th1 e Th2, promovem imunidade mediada

por células em uma situação e suprimem a mesma imunidade celular em outra situação. As atividades das células iNKT podem ser benéficas ou prejudiciais em diferentes situações, aspecto este relacionado ao balanço entre as repostas imunes Th1 e Th2 mediadas pelas células iNKT (Lin et al., 2006). Em humanos as células iNKT CD4⁺ produzem citocinas de ambas as respostas Th1 e Th2 (IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 e IL-13). De forma diversa, as células iNKT CD8⁺ e iNKT CD4-CD8- (duplo negativo, DN) produzem, primariamente, citocinas Th1 (IFN γ , TNF α) (Gumperz et al., 2002; Coquet et al., 2008).

Em estudo publicado em 2011 sobre subtipos de células iNKT expandidas e estimuladas de doadoras saudáveis, os autores observaram um percentual de expressão de subtipos de iNKT frescas de 15,6 $\pm$ 9,0%, 48,6 $\pm$ 15,4% e 33,5 $\pm$ 18,1% para CD4⁺, DN e CD8⁺ respectivamente. Foi observado, também, que os três subtipos de células iNKT são capazes de secretar citocinas Th1 e Th2 com iNKT CD8⁺ demonstrando atividade Th1 / citolítica mais potente e as células CD4⁺ a atividade Th2 mais intensa. As células NKTDN apresentaram atividade intermediária entre perfil Th1/Th2. Ainda em relação a esse estudo, os autores avaliaram a secreção das citocinas de resposta Th1, Th2, Th9, Th17 e Th22 (IFN γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a e IL-22) por citometria de fluxo após estimulação dos três subtipos de iNKT (O'Reilly et al., 2011). Os resultados foram descritos de acordo com a intensidade da secreção da citocina nos subtipos CD4⁺, DN e CD8⁺.

Tabela 1 - Intensidade de secreção de citocinas pelos subtipos de células iNKT CD4+, DN e CD8+ após estimulação. Adaptado de O'Reilly et al., 2011

Citocina	CD4 ⁺	DN	CD8 ⁺
IFN γ	-	$\pm$	+
TNF α	-	$\pm$	+
IL-2	+	$\pm$	$\pm$
IL-4	+	$\pm$	-
IL-5	+	$\pm$	-
IL-6	+	+	+
IL-9	+	0	0
IL-10	+	-	-
IL-12p70	+	+	+
IL-13	+	$\pm$	-
IL-17a	0	+	0
IL-22	0	0	0

(+) = mais intensa, ($\pm$) = intermediária (-) = menos intensa e (0) = ausente.

Os diferentes perfis de citocinas produzidas pelas células iNKT sugerem que essas células podem ter ações diferentes nas diversas células imunes efetoras importantes nas respostas imunes Th1 e Th2 (Lin et al., 2006). Após estimulação das subpopulações de células iNKT (CD4+, CD8+ e CD4-CD8-), este estudo observou que as células iNKT CD4+ induziram a maior ativação das células NK e células B sem ativação das células T CD8+, as células iNKT CD8+ induziram a ativação das células envolvidas na resposta Th1 (células NK e células T CD8+) e as células iNKT DN induziram a menor ativação das células NK e B, moderada atividade estimuladora sobre as células T CD4+ e ausência de atividade sobre as células T CD8+ (Lin et al., 2006).

Em 2013, um estudo australiano demonstrou a heterogeneidade entre diferentes tecidos e sangue periférico dentro das subpopulações CD4⁺ e CD4⁻ das células iNKT (Chan et al., 2013). Nesse estudo, a análise comparativa revelou alta heterogeneidade na expressão de antígenos de superfície por subtipos de células iNKT CD4⁺ e CD4⁻. Além disso os autores identificaram vários antígenos cuja expressão diferencial correlaciona com a resposta à citocina (Chan et al., 2013). Os achados revelam que a classificação de subtipos de células iNKT CD4⁺ e CD4⁻ é deficiente em demonstrar a diversidade desta linhagem celular (Chan et al., 2013).

As células iNKT CD4⁺, DN e CD8⁺ podem ajudar na diferenciação das células B e induzir a secreção de anticorpos pelos linfócitos B (Zeng et al., 2013). Em 2013 demonstrou-se que todos os principais subtipos de células iNKT expandidas induziram a secreção de IgG, IgA e IgM por células B autólogas, mas não de IgE (Bai et al., 2001, Zeng et al., 2013).

Vários estudos demonstraram que alterações na frequência e funções dos subtipos de células iNKT foram observadas em indivíduos com doenças (Araki et al., 2003; Kenna et al., 2003; Montoya et al., 2007; Im et al., 2008; Bricard et al., 2009). Nos últimos anos, estudos têm demonstrado possibilidade de terapia imunológica com estimulação específica de subtipos de iNKT para alguns tipos de doenças. Vários grupos estão tentando modular o perfil efetor das células iNKT com fins de aplicação terapêutica por meio de modificação do ambiente de citocinas, do modo de ativação celular e da estrutura dos antígenos glicolipídicos (O'Reilly et al., 2011).

As células iNKT são caracterizadas pela expressão de um receptor de células T invariante com os marcadores $V\alpha 24j\alpha 18$ e $V\alpha 11$. A partir da identificação de linfócitos T viáveis, as células iNKT podem ser selecionadas por citometria de fluxo utilizando-se os marcadores $V\beta 24j\alpha 18$ e $V\alpha 11$ específicos para estas células.

1.5 Células iNKT e endometriose

Apesar da comprovada relação entre a endometriose e sistema imunológico, não há na literatura estudo que tenha avaliado a correlação entre endometriose e células *iNKT*.

Diante das importantes informações que correlacionam alterações no sistema imunológico com a endometriose e da importância das células iNKT no controle do sistema imune identificamos a hipótese de que essas células podem estar alteradas em pacientes com endometriose pélvica profunda. A comprovação dessa hipótese é importante passo no sentido de identificar o papel das células iNKT em relação ao fator imunológico da doença, permitindo, assim, maior entendimento sobre o sistema imune e a gênese da endometriose.

2 Objetivos

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos:

- a) Analisar a presença de células iNKT e seus subtipos no sangue em pacientes com endometriose profunda infiltrativa e em pacientes sem a doença;
- b) Analisar a secreção de citocinas pelas células iNKT e seus subtipos em pacientes endometriose e sem a doença;
- c) Relacionar a presença de células iNKT e seus subtipos no sangue em pacientes com endometriose e:
 - c.1) sintomas clínicos
 - c.2) fase do ciclo menstrual
 - c.3) estadiamento da endometriose
- d) Analisar a presença de células iNKT no tecido comparando lesão de endometriose com área adjacente sem endometriose.

3 Métodos

3. MÉTODOS

Realizamos um estudo transversal no Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em que foram avaliadas 73 pacientes consecutivas submetidas à videolaparoscopia no período de julho de 2013 a julho de 2015. As pacientes foram divididas em dois grupos, sendo grupo endometriose (n=47) aquelas com endometriose profunda infiltrativa e grupo controle (n=26) as pacientes sem endometriose.

Previamente ao início do estudo, o cálculo amostral foi realizado supondo confiança de 95% e poder de 80%, sabendo que estudos anteriores mostraram que o percentual de células iNKT no sangue em mulheres normais varia de 0,1% a 2%, logo, foi considerado o valor médio dessa variabilidade para cálculo da amostra (0,95%) e dado um desvio padrão aproximado de 0,27% nas células iNKT seriam necessárias 29 mulheres em cada grupo para identificar diferença média de 0,2% de células iNKT entre mulheres com e sem endometriose (Carvalho et. al., 2010). Caso a diferença esperada seja de pelo menos 0,5% entre os grupos, a amostra necessária para realização do estudo é de 5 mulheres em cada grupo.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 1). Todas as pacientes foram esclarecidas sobre o estudo, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2

e 3). Este estudo foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/05425-7.

3.1 Critérios de inclusão e exclusão

As pacientes com endometriose foram selecionadas segundo os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 49 anos; presença endometriose profunda infiltrativa intestinal e/ou retrocervical com comprovação histológica em espécimes obtidos durante a cirurgia; períodos menstruais eumenorreicos, com intervalo entre os ciclos variando de 26-34 dias. Para o grupo controle, os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 49 anos; ausência endometriose confirmada pela laparoscopia ou anatomopatologia (em casos de biópsia de lesões suspeitas); períodos menstruais eumenorreicos, com intervalo entre os ciclos variando de 26-34 dias.

Os critérios de exclusão utilizados para ambos os grupos foram: presença de doenças autoimunes confirmadas por anamnese, exame físico e por exames laboratoriais quando necessário; presença de neoplasia maligna suspeita ou diagnosticada; diagnóstico de processos infecciosos nos três meses prévios à cirurgia; presença de sinais clínicos ou laboratoriais de falência ovariana; utilização de terapêutica hormonal (análogos do GnRH, progestagênios e contraceptivos hormonais) nos últimos três meses que antecederam a coleta da amostra.

3.2 Dinâmica do estudo

As pacientes com suspeita clínica de endometriose foram avaliadas com história clínica, exame físico e exames complementares como a ultrassonografia pélvica transvaginal com preparo intestinal e a ressonância nuclear magnética de acordo com a rotina do Setor de Endometriose do HCFMUSP. A cirurgia foi indicada para os casos de pacientes com sintomas de dor e/ou infertilidade em consonância com os achados dos exames clínicos e radiológicos. Nos casos de pacientes com dor, mas sem achados relevantes nos exames de imagem, a cirurgia foi indicada quando não houve melhora dos sintomas ao tratamento clínico com contraceptivos hormonais orais combinados e/ou antiinflamatórios. Em relação às pacientes submetidas a videolaparoscopia por endometriose no período do estudo, foram selecionados 47 casos que se adequavam aos critérios de inclusão e exclusão.

O grupo controle foi formado por pacientes submetidas à laparoscopia para laqueadura tubária no HCFMUSP que não infringiam os critérios de inclusão e exclusão propostos no estudo.

A videolaparoscopia, em ambos os grupos, foi realizada de acordo com o protocolo do setor do HCFMUSP. As pacientes do grupo com endometriose tiveram as lesões ressecadas. Durante o procedimento cirúrgico, foram identificados os locais das lesões e feito o estadiamento da doença. No grupo controle, foi realizado inventário minucioso da cavidade abdominal para descartar a presença de lesões de endometriose e realizada

biópsia nas lesões eventualmente suspeitas. A história clínica das pacientes e as características intraoperatórias da doença foram transcritas em formulário específico para uso posterior dos dados nos cálculos estatísticos.

As amostras de sangue foram coletadas das pacientes com endometriose no momento da realização da laparoscopia. Os dados provenientes das pacientes portadoras de endometriose foram considerados após exame histológico (estadiamento e local) das lesões de endometriose. Como grupo controle, foram utilizadas amostras de sangue de pacientes saudáveis, não portadoras de endometriose, obtidas durante procedimento para laqueadura tubária. Um total de 73 amostras de sangue foi avaliado neste estudo.

O sangue periférico foi coletado por punção venosa no antebraço, após indução da anestesia geral. Em seguida, foi transferido para um tubo contendo anticoagulante. Após a coleta das amostras de todos os casos, foram realizadas a separação das células e armazenadas para futuros experimentos.

3.3 Quadro clínico

Quanto aos sintomas clínicos, foram considerados os seis sintomas mais frequentes associados à endometriose, descritos abaixo. Todas as pacientes do estudo foram inqueridas sobre a presença e a intensidade destes sintomas com uso da Escala Visual Analógica (EVA) de dor (Anexo

4). Os sintomas foram classificados em leves ou intensos de acordo com $EVA < 7$ ou $EVA \geq 7$, respectivamente.

- a) dismenorreia: dor em cólica no período menstrual;
- b) dispareunia de profundidade: dor pélvica e/ou no fundo vaginal durante a relação sexual;
- c) dor pélvica acíclica: dor pélvica sem relação com o ciclo menstrual por, pelo menos, três meses, sem melhora com uso de analgésicos;
- d) alterações urinárias cíclicas: sintomas urinários durante o período menstrual, incluindo disúria, hematúria, polaciúria e/ou urgência miccional;
- e) alterações intestinais cíclicas: sintomas intestinais durante o período menstrual, incluindo aceleração ou diminuição do trânsito intestinal, dor à evacuação, puxo, tenesmo e/ou sangramento nas fezes;
- f) infertilidade: dificuldade para engravidar em casal com vida sexual ativa (duas ou mais relações sexuais por semana) e sem método contraceptivo por, pelo menos, um ano. Pacientes em uso de métodos naturais ou de barreira e pacientes não expostas a gravidez até o momento do estudo foram classificadas como “sem tentativa”.

3.4 Estadiamento da Endometriose

As lesões de endometriose foram classificadas durante o procedimento cirúrgico de acordo com os critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (ASMR), revisado em 1996, em estádios de I – IV (Figura 1).

Estádio I (mínima): 1-5

Estádio II (leve): 6-15

Estádio III (moderada): 16-40

Estádio IV (severa): > 40

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

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

Figura 1 – Classificação de endometriose da *American Society for Reproductive Medicine*, revisada em 1996

Para fins de comparação e cálculos estatísticos, definimos os estádios I e II como estádios iniciais e os estádios III e IV como estádios avançados (ASRM, 1997).

3.5 Locais da endometriose

As pacientes com endometriose foram selecionadas de acordo com a presença de lesão de endometriose profunda infiltrativa no retossigmoide e/ou na região retrocervical (Figuras 2).

Figura 2 - A - Endometriose profunda de retossigmoide aderida à região retrocervical. **B** - Endometriose profunda de região retrocervical, envolvendo os ligamentos útero-sacros bilaterais

3.6 Confirmação da endometriose

Os tecidos excisados na cirurgia foram fixados em formalina e blocos de parafina, posteriormente coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliadas em microscópio ótico para confirmação do diagnóstico da endometriose.

3.7 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

3.7.1 Sangue heparinizado

O sangue foi centrifugado a 3000 rpm a 10° C durante 8 min. O plasma foi descartado.

O precipitado de leucócitos totais foi retirado e lavado com solução fisiológica (previamente aquecida em banho-maria à 37°C), centrifugado novamente a 3000 rpm a 10° C durante 8 min. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram colocadas em 2 mL de meio de cultura DMEM contendo soro bovino fetal 10% (previamente aquecida em banho-maria a 37°C) para contagem, em câmara de Neubauer, do número total de células.

Os leucócitos totais foram estocados em nitrogênio líquido em alíquotas contendo 2×10^6 células em 1 mL de meio de congelamento (soro bovino fetal + 5% DMSO, em temperatura ambiente).

3.8 Análise dos marcadores de células iNKT por citometria de fluxo

3.8.1 Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Esse procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizada por 15 minutos sob luz ultravioleta.

As amostras de CMSP criopreservadas foram mantidas em gelo seco até o momento do seu descongelamento. Os criotubos foram parcialmente descongelados em banho-maria a 37°C. Foi adicionado 1mL de meio de cultura R10 nas células, gotejado lentamente. Posteriormente, foi transferido o conteúdo total da amostra para um tubo cônico contendo R10, previamente identificado, utilizando-se, também, do procedimento de gotejamento. Para a realização da lavagem das células, foi adicionado mais 1mL de R10 e esse volume transferido para o tubo contendo R10.

Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 min a 250 $\times g$ em temperatura de 4 a 6°C; o sobrenadante desprezado e adicionados 2mL de R10, para realização da contagem celular por meio da câmara de Neubauer e do contador celular automatizado Countess™ (Invitrogen), utilizando os mesmos procedimento e cálculos descritos anteriormente.

Novamente o tubo foi centrifugado e as células ressuspensas em R10 no volume de $1,0 \times 10^6$ células/ml e as células foram transferidas, respectivamente, para uma placa de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificada.

3.8.2 Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico

Com o objetivo de caracterizar as células T *Natural Killer* – iNKT do sangue periférico, as amostras descongeladas foram processadas para

realização de imunofenotipagem de superfície celular utilizando-se a técnica de citometria de fluxo.

Após a transferência das células para uma placa de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificada, a placa foi centrifugada a 250 *xg* por 5 min., para a lavagem celular. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 170 µL de Tampão MACS, composto por 498ml de tampão salina fosfatada 7,2 (GIBCO™) (PBS 1X), 2 mL de EDTA [500mM], 2,5 g de albumina de soro bovino (SIGMA®) (BSA). Após centrifugação subsequente, o sobrenadante foi desprezado.

Para iniciar a marcação das proteínas presentes na superfície das células, foram adicionados tampão MACS, e os anticorpos monoclonais CD3 (clone UCHT1), Vβ11 (clone C21) e Vα24 (clone C15) da Beckman Coulter (Califórnia, CA, EUA); CD4 (clone RPA-T4), CD8 (clone RFT-8), CD14 (clone M5E2), CD19 (clone HIB19), CD25 (clone M-A251) da Biolegend (San Diego, CA, USA) e CCR7 (clone 3D12) da BD Bioscience (San Jose, CA, USA) previamente titulados, assim como o marcador de viabilidade *Live/Dead*. As células permaneceram sob incubação por 30 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Após o término da incubação, a placa foi centrifugada a 250 *xg* por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 170 µL de tampão MACS, para serem novamente, centrifugadas, por duas vezes. Na etapa final da técnica de imunofenotipagem de superfície celular, foram adicionados 100 µl de paraformaldeído a 1% (PFA 1%), composto por 9 mL de PBS (1x) e 1 mL de

paraformaldeído 10x (SIGMA®), visando promover a fixação dos anticorpos monoclonais à superfície celular.

Em seguida, as células foram transferidas, respectivamente, para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) previamente identificados e permaneceram armazenadas sob refrigeração até o momento da leitura no citômetro de fluxo modelo LSRFortessa (BD), dotado de detectores capazes de adquirir e analisar eventos com até 14 cores.

Os linfócitos foram identificados entre as células mononucleares do sangue periférico por meio da citometria de fluxo utilizando-se o *Forward-scattered light* (FSC) que avalia as partículas de acordo com a área de superfície celular ou tamanho da célula e o *Side-scattered light* (SSC) que avalia a granularidade celular ou a complexidade interna da célula (Figura 6A). Dessa forma é possível diferenciar os linfócitos das outras células mononucleares. A partir da identificação dos linfócitos por tamanho (FSC) e complexidade (SSC), foi, então, realizada a avaliação da viabilidade celular utilizando-se os marcadores live/dead (Figura 6B). Os marcadores CD14 e CD19 foram utilizados para diferenciar os linfócitos T dos monócitos que expressam o CD14 e o linfócito B que expressa o CD19 (Figura 6B). Após essa estratégia de obrigatoriamente ser negativo para CD14/CD19 e marcador de viabilidade, precedeu-se à marcação de linfócitos T utilizando a proteína CD3.

Identificados os linfócitos T, realizou-se um dot plot com os marcadores CD4 e CD8 para identificar os subtipos de linfócitos (Figura 6C) e outro dot plot com marcadores V β 11 e V α 24 duplos marcados específicos

para células iNKT (Figura 6D). As células iNKT foram selecionadas do gate $V\beta 11^+ V\alpha 24^+$ para posterior identificação dos subtipos de células iNKT. Os subtipos de linfócitos e de células iNKT foram identificados com uso dos marcadores CD4, CD8, CD25 e CCR7 (Figuras 6, 7 e 8). Foram verificadas as frequências de linfócitos T $CD3^+$, $CD3^+CCR7^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD4^+CCR7^+$, $CD3^+CD4^+CD25^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD8^+CCR7^+$, $CD3^+CD8^+CD25^+$, $CD3^+CD25^+$) e de células iNKT e seus subtipos $NKTCD8^+$, $iNKT\ CD8^+CCR7^+$, $iNKT\ CD8^+CD25^+$, $iNKT\ DP$, $iNKT\ CD4^+$, $iNKT\ CD4^+CCR7^+$, $iNKT\ CD4^+CD25^+$, $iNKT\ DN$, $iNKT\ DN\ CCR7^+$ e $iNKT\ DN\ CD25^+$.

Figura 3 - Representação gráfica de Imunofenotipagem. *Density Plot* de citometria de fluxo de linfócitos (3a), seleção de gate para análise de viabilidade celular (3b), seleção de gate de linfócitos $CD3^+$ para $CD4^+$ e $CD8^+$ (3c) e células *natural Killer T* (iNKT) (3d)

Figura 4 - Representação gráfica de Imunofenotipagem. *Density Plot* de citometria de fluxo de linfócitos CD3 (4a), CD3+CCR7+ (4b) e CD3+CD25+ (4c). *Density Plot* de citometria de fluxo de linfócitos CD4+ e CD8+ (4d), seleção de gate de linfócitos CD8+CCR7+ (4e), CD8+CD25+ (4f) e linfócitos CD4+CCR7+ (4g) e CD4+CD25+ (4h)

Figura 5 - Representação gráfica de Imunofenotipagem de células iNKT e seus sub-tipos (5b – 5h). *Density Plot* de citometria de fluxo de células iNKT com marcadores *Vbeta11* e *Valpha24* (5a), seleção de gate de células iNKT CD4+ e iNKT CD8+ (5b), seleção de gate de células iNKT CD8+ CCR7+ (5c) e iNKT CD8+ CD25+ (5d), seleção de gate de células iNKT DN CCR7+ (5e) e iNKT DN CD25+ (5f), seleção de gate de células iNKT CD4+CCR7+ (5g) e iNKT CD4+CD25+ (5h)

O resultado da citometria de fluxo identificou as porcentagens de células iNKT e seus subtipos no sangue periférico das pacientes dos dois grupos de estudo.

3.8.3 Estimulação das células iNKT para medição de citocinas

Para a medição da produção de citocinas, as células mononucleares do sangue periférico foram descongeladas e incubadas na presença de α -galactosilceramida (α GalCer), uma substância agonista específica de iNKT. Após 1 hora a 37°C e CO₂ a 5%, adicionou-se Monensina (Golgi Stop, BD Biosciences) e Brefeldina A (Golgi Plug, BD Biosciences). Após incubação durante 18 h, as células foram lavadas e incubadas com anticorpos monoclonais para a superfície. As células foram lavadas e fixadas e permeabilizadas utilizando reagentes de fixação / permeabilização da Life Technologies de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas com IL-10 (clone JES3-1931), da Beckman Coulter (Califórnia, CA, EUA), IL-6 (clone MQ2-13A5) da BD (San Jose, CA, EUA) e IL-17 (clone : BL168) da Biolegend (San Diego, CA, EUA). As células foram adquiridas em um citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences). Células não estimuladas foram usadas para cada painel, para análise intracelular. Todas as amostras foram adquiridas usando o software FACSDiva (BD Biosciences) e, em seguida, analisadas com o software FlowJo versão 9.9 (Tree Star).

3.8.4 Marcação por imunofluorescência na microscopia confocal

As lesões de endometriose foram cortadas em seções de 5mM para a realização da marcação da imunofluorescência. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, para a realização da leitura por um patologista para definir o local específico das lesões de endometriose e áreas saudáveis nas seções. Depois disto, as seções foram desparafinadas e submetidas a uma etapa de recuperação de epitopos incubados aquecido durante 15 minutos em microondas em solução tampão de citrato de sódio. Depois disto, foram incubados durante a noite a 4°C, com anticorpos primários, anticorpo CD1d de camundongo anti-humano de (BD Biosciences) e anticorpo policlonal de coelho CD3 anti-humano da Abcam (Cambridge, UK). Em seguida, os tecidos foram lavados e incubados com anticorpos secundários Alexa 488 anti-camundongo e Alexa 568 anti-coelho da Life Technologies, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram lavados e incubados com anti-CD4 (clone RPA-T4), por 2 horas. E finalmente, incubado com DAPI por 5 minutos e a fixação da lâmina foi realizada com o reagente antifade da Prolong Golg Life Technologies, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As seções foram gravadas usando uma versão 11.0 do ZEN 2012 SP2 (preto, 64 bits) (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

3.9 Análise estatística

Para elaboração do estudo proposto nesta tese, foram observadas mulheres com endometriose profunda infiltrativa intestinal e/ou retrocervical e mulheres sem endometriose relativamente ao percentual de células iNKT e subtipos no sangue periférico.

Além das células iNKT e subtipos, as mulheres foram avaliadas segundo grau de sintomas apresentados com uso de escalas visuais analógicas (EVA).

O objetivo do estudo é verificar se os percentuais de células iNKT e seus subtipos diferem entre os grupos de mulheres com endometriose e sem endometriose.

As características pessoais e clínicas qualitativas foram descritas segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e verificada a associação com os grupos com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos (teste exato de Fisher ou teste da razão de verossimilhanças) (Kirkwood; Sterne, 2006), os escores de sintomas foram descritos segundo grupos com uso de medidas, mínimos e máximos e comparado entre os grupos com uso de testes Mann-Whitney (Kirkwood; Sterne, 2006) e as idades e IMC dos pacientes foram descritos segundo grupos com uso de média e desvio padrão e comparados entre os grupos com uso de testes t-Student (Kirkwood; Sterne, 2006).

Os níveis de iNKT e percentuais de cada tipo de célula foram descritos segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio

padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparado entre os grupos com uso de testes Mann-Whitney.

Apenas nos pacientes com endometriose profunda, foram descritos os valores de iNKT e dos percentuais de cada tipo de célula segundo cada sintoma categorizado como ausente/leve e grave (≥ 7 pontos), infertilidade e estágio com uso de medidas resumo e comparados os valores das células iNKT e percentuais de cada tipo de célula segundo os sintomas com uso de testes Mann-Whitney. Para ambos os grupos as células iNKT e os percentuais de cada tipo foram comparados entre as fases do ciclo menstrual e em cada fase do ciclo foram comparados os grupos com uso de testes Mann-Whitney, porém devido ao número de comparações da mesma variável foi considerado nível de significância de 0,0125 ($p= 0,0125$) conforme correção de Bonferroni.

As análises foram realizadas com uso do *software* IBM-SPSS for Windows versão 20.0 e tabulados com uso do *software* Microsoft-Excel 2003 e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4 Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Dados demográficos e clínicos

Os dados clínicos das pacientes selecionadas foram comparados para avaliação de semelhança entre os grupos. A Tabela 2 mostra que não houve diferença significativa na idade média das pacientes no dia da cirurgia ($p=0,0876$). Entretanto, o IMC médio das pacientes com endometriose profunda foi estatisticamente menor do que daquelas do grupo controle ($p = 0,046$). Da mesma forma, a fase do ciclo menstrual na data da cirurgia não foi diferente entre os grupos estudados ($p=0,067$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação de semelhança dos dados clínicos de idade, índice de massa corpórea e fase do ciclo menstrual entre as pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose

Variável	Grupo		Total (N=73)	p
	Controle (N=26)	Endometriose (N=47)		
Idade (anos), média $\pm$ DP	34,5 $\pm$ 4,6	34,3 $\pm$ 6,2	34,4 $\pm$ 5,7	0,876 **
IMC (Kg/m²), média $\pm$ DP	24,1 $\pm$ 3,1	22,5 $\pm$ 3,3	23 $\pm$ 3,3	0,046**
Fase do ciclo menstrual, n (%)				0,067
Proliferativa	14 (53,8)	15 (31,9)	29 (39,7)	
Secretora	12 (46,2)	32 (68,1)	44 (60,3)	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; # Teste da razão de verossimilhanças; ** Teste t-Student; £ Teste Mann-Whitney

A intensidade dos sintomas clínicos, segundo escala visual analógica de dor, foi comparada para avaliação de semelhança entre os grupos de endometriose profunda e sem endometriose (Tabela 3). O número de pacientes com níveis de sintomas intensos ($EVA \geq 7$) foi estatisticamente maior nas pacientes com endometriose profunda para os sintomas de dismenorréia ($p < 0,001$), dor pélvica acíclica ($p < 0,001$), dispareunia ($p < 0,038$) e alteração intestinal cíclica ($p < 0,001$). Apenas para o quadro de alteração urinária cíclica não foi observada diferença no número de pacientes com sintomas mais intensos na comparação entre os dois grupos ($p > 0,999$). A infertilidade também foi estatisticamente maior nas mulheres com endometriose profunda quando comparadas ao grupo sem endometriose ($p < 0,001$).

Tabela 3 - Avaliação de semelhança dos sintomas clínicos entre as pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose

Variável	Grupo		Total (N = 73)	p
	Controle (N = 26)	Endometriose (N = 47)		
DM, n (%)				<0,001
EVA < 7	23 (88,5)	17 (36,2)	40 (54,8)	
EVA ≥ 7	3 (11,5)	30 (63,8)	33 (45,2)	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 10)	8 (0; 10)	5 (0; 10)	<0,001£
DPA, n (%)				0,308*
EVA < 7	24 (92,3)	38 (80,9)	62 (84,9)	
EVA ≥ 7	2 (7,7)	9 (19,1)	11 (15,1)	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 10)	0 (0; 10)	0 (0; 10)	0,038£
DP, n (%)				0,084*
EVA < 7	25 (96,2)	37 (78,7)	62 (84,9)	
EVA ≥ 7	1 (3,8)	10 (21,3)	11 (15,1)	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 8)	0 (0; 10)	0 (0; 10)	<0,001£
AIC, n (%)				0,046*
EVA < 7	26 (100)	40 (85,1)	66 (90,4)	
EVA ≥ 7	0 (0)	7 (14,9)	7 (9,6)	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 5)	0 (0; 10)	0 (0; 10)	0,038£
AUC, n (%)				>0,999*
EVA < 7	26 (100)	46 (97,9)	72 (98,6)	
EVA ≥ 7	0 (0)	1 (2,1)	1 (1,4)	
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	0 (0; 8)	0 (0; 8)	0,191£
Infertilidade, n (%)				<0,001#
Não	26 (100)	9 (19,1)	35 (47,9)	
Sim	0 (0)	25 (53,2)	25 (34,2)	
Sem tentativa	0 (0)	13 (27,7)	13 (17,8)	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; # Teste da razão de verossimilhanças; ** Teste t-Student; £ Teste Mann-Whitney. Sintomas clínicos baseados na escala visual analógica de dor (0 – 10). DM: dismenorréia; DPA: dor pélvica acíclica; DP: disporeunia; AIC: alteração intestinal cíclica; AUC: alteração urinária cíclica.

4.2 Estadiamento da endometriose

O estadiamento da doença foi avaliado nas pacientes com a doença. A tabela 4 mostra os resultados encontrados onde há um número de pacientes com endometriose estágio III e IV é três vezes superior ao de pacientes com endometriose grau I e II (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação de semelhança em relação ao estágio da endometriose entre as pacientes com endometriose profunda infiltrativa

Variável	Grupo		Total (N = 73)
	Controle (N = 26)	Endometriose (N = 47)	
Estadio, n (%)			
I/II	0 (0%)	11 (23,4)	11 (23,4)
III/IV	0 (0%)	36 (76,6)	36 (76,6)

Estadiamento I-II: mínimo-leve, III-IV: moderado-grave.

4.3 Análise das frequências das células iNKT

As células iNKT foram avaliadas em relação sua frequência no sangue periférico entre os dois grupos do estudo. Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao percentual de células iNKT no sangue ($p=0,010$) de pacientes com endometriose profunda infiltrativa em comparação àquelas sem endometriose (Tabela 5).

Tabela 5 - Descrição das médias das frequências das células iNKT no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e resultado da comparação entre os grupos

Variável	Grupo		Total (N = 73)	p
	Controle (N = 26)	Endometriose (N = 47)		
NKT, média $\pm$ DP	0,23 $\pm$ 0,25	0,17 $\pm$ 0,55	0,2 $\pm$ 0,46	0,010

Teste de Mann-Whitney; DP = desvio padrão.

Gráfico 1 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose

4.4 Análise das frequências dos subtipos de células iNKT

A frequência dos subtipos das células iNKT CD4+, DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 nessas células foi avaliada comparativamente entre as pacientes com e sem endometriose. Foi observado uma menor frequência de células iNKT DN nas mulheres com endometriose em relação às aquelas sem endometriose ($p=0,020$). Não houve diferença significativa nos outros subtipos CD4+ e DN (Tabela 6).

Tabela 6 - Descrição das médias das frequências dos subtipos de células iNKT CD4+, DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e resultado da comparação entre os grupos. Resultados em média e desvio padrão

Variável	Grupo		Total (N = 73)	p
	Controle (N = 26)	Endometriose (N = 47)		
iNKT CD4+	32,2 ± 21	37 ± 27,4	35,2 ± 25,1	0,673
iNKT CD4+/CCR7	31,6 ± 31	35,6 ± 30,6	34,1 ± 30,6	0,439
iNKT CD4+/CD25	25,8 ± 18,5	33,5 ± 23,1	30,8 ± 21,8	0,168
iNKT DN	48,2 ± 21,4	34,6 ± 24,5	39,6 ± 24,2	0,020
iNKT DN/CCR7	6,76 ± 14,08	11,18 ± 15,87	9,54 ± 15,27	0,801
iNKT DN/CD25	33,8 ± 29,8	39,7 ± 31,8	37,4 ± 30,9	0,416

Teste Mann-Whitney

Os subtipos de células iNKT CD4+, CD8+ e DN foram avaliadas em relação secreção de IL-6, IL-10 e IL-17. A frequência das células iNKT DN IL17 menor no grupo de pacientes com endometriose comparadas ao grupo controle sem endometriose ($p=0,050$). Não houve diferença significativa nos outros subtipos CD4+, CD8+ e DN (Tabela 7).

Tabela 7 - Descrição das médias das frequências dos subtipos de células iNKT secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e resultado da comparação entre os grupos. Resultados em média e desvio padrão

Variável	Grupo		Total (N = 73)	p
	Controle (N = 26)	Endometriose (N = 47)		
iNKT CD4+/IL6	5,55 ± 5,71	1,37 ± 1,94	3,09 ± 4,34	0,081
iNKT CD4+/IL10	3,08 ± 2,26	4,36 ± 5,51	3,86 ± 4,48	0,856
iNKT CD4+/IL17	13 ± 4	8,7 ± 5,5	10,4 ± 5,3	0,160
iNKT CD8+/IL6	6,37 ± 5,8	3,44 ± 4,25	4,42 ± 4,89	0,196
iNKT CD8+/IL10	3,81 ± 2,91	4,53 ± 3,88	4,29 ± 3,53	0,881
iNKT CD8+/IL17	9,11 ± 4,65	10,99 ± 14,18	10,36 ± 11,75	0,455
iNKT DN/IL6	1,99 ± 2,57	0,74 ± 1,12	1,21 ± 1,86	0,127
iNKT DN/IL10	0,35 ± 0,39	0,44 ± 0,88	0,41 ± 0,72	0,356
iNKT DN/IL17	11,5 ± 5	7,8 ± 4,2	9,2 ± 4,8	0,050

Teste Mann-Whitney

Quadro 1 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT DN (A) e iNKT DN IL17+ (B) no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose

4.5 Análise das frequências das células iNKT e subtipos em relação aos sintomas da endometriose

As células iNKT e os subtipos estudados foram avaliadas em relação às suas frequências e a intensidade dos sintomas de dismenorréia, dispareunia, dor pélvica acíclica, alteração intestinal cíclica e alteração urinária cíclica nas pacientes com endometriose profunda infiltrativa. A intensidade dos sintomas foi dividida em dois grupos < 7 e ≥ 7 de acordo com a EVA de dor.

No Gráfico 2, mostramos o resultado da comparação das médias das frequências das células iNKT, subtipos iNKT CD4+, iNKT DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa versus o grupo controle e a intensidade do sintoma clínico de dismenorréia. Foi observado uma significativa menor frequência das células iNKT CD4+ CCR7 nas pacientes com endometriose profunda em comparação as pacientes sem a doença. Não houve diferença significativa em relação aos outros subtipos de iNKT com expressão dos marcadores CCR7 e CD25. As frequências dos subtipos de células iNKT CD4+, CD8+ e DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 também foram avaliadas nas pacientes com endometriose profunda infiltrativa e grupo controle em relação à intensidade da dismenorréia (Gráfico 2). A frequência das células iNKT CD4+ IL17 foi significativamente menor no grupo de pacientes com dismenorréia leve (EVA < 7) comparadas ao grupo com dismenorréia

intensa (EVA ≥ 7). Não houve diferença significativa nos outros subtipos de células CD4+, CD8+ e DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sintomas clínicos de dismenorréia com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA

No Quadro 2 podemos observar a distribuição das frequências de células iNKT CD4⁺ CCR7⁺ e iNKT CD4⁺ IL-17⁺ no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e intensidade de sintoma de dismenorréia (Quadro 2).

Quadro 2 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT CD4⁺ CCR7⁺ (A) e iNKT CD4⁺ IL17⁺ (B) no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e intensidade de sintoma de dismenorréia

A seguir demonstramos o resultado da comparação das médias das frequências das células iNKT, subtipos iNKT CD4+, iNKT DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa versus o grupo controle e a intensidade do sintoma clínico de dor pélvica acíclica. Não foi observado diferença estatisticamente significativa na frequência destas células e a intensidade da dor pélvica acíclica. As frequências dos subtipos de células iNKT CD4+, CD8+ e DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 também foram avaliadas nas pacientes com endometriose profunda infiltrativa em relação ao grupo controle e a intensidade da dor pélvica acíclica (Gráfico 3). Dentre estas, apenas a frequência das células iNKT CD4+ IL17 foi significativamente menor no grupo de pacientes com dor pélvica acíclica leve comparadas ao grupo com dor intensa (Gráfico 4). Não houve diferença significativa nos outros subtipos CD4+, CD8+ e DN.

Os resultados da comparação das médias das frequências das células iNKT, subtipos iNKT CD4+, iNKT DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa versus pacientes do grupo controle e a intensidade do sintoma clínico de dispareunia estão demonstrados no Gráfico 5. Não foi observado diferença estatisticamente significativa na frequência destas células e a intensidade da dispareunia entre os grupos. As frequências dos subtipos de células iNKT CD4+, CD8+ e DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 também foram avaliadas nas pacientes com endometriose profunda infiltrativa e no grupo controle. Não houve diferença significativa nos subtipos CD4+, CD8+ e DN entre os grupos (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e sintomas clínicos de dispareunia com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA

Os resultados da comparação das médias das frequências das células iNKT, subtipos iNKT CD4+, iNKT DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa versus o grupo controle e a intensidade do sintoma clínico de alteração intestinal cíclica estão demonstrados no Gráfico 6. Não foi observado diferença estatisticamente significativa na frequência destas células e a intensidade da alteração intestinal cíclica entre os grupos. As frequências dos subtipos de células iNKT CD4+, CD8+ e DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 também foram avaliadas nas pacientes com endometriose profunda infiltrativa e no grupo controle. Não houve diferença significativa nas frequências dos subtipos CD4+, CD8+ e DN (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e sintomas clínicos de alteração intestinal cíclica com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA

Os resultados da comparação das médias das frequências das células iNKT, subtipos iNKT CD4+, iNKT DN e a expressão de marcadores CCR7 e CD25 no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e de pacientes do grupo controle em relação a intensidade do sintoma clínico de alteração urinária cíclica estão demonstrados no Gráfico 7. Não foi observado diferença estatisticamente significativa na frequência destas células e a intensidade da alteração urinária cíclica. As frequências dos subtipos de células iNKT CD4+, CD8+ e DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 também foram avaliadas nas pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose. Não houve diferença significativa nos subtipos CD4+, CD8+ e DN entre os grupos (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e sintomas clínicos de alteração urinária cíclica com intensidade <7 e ≥ 7 segundo a EVA

4.6 Análise das células iNKT e o estágio da endometriose

Um outro aspecto avaliado no presente estudo foi a relação entre a frequência das células iNKT e seus subtipos com o estágio da endometriose. As médias das frequências das células iNKT, subtipos iNKT CD4+, iNKT DN com a expressão de marcadores CCR7 e CD25, assim como dos subtipos de células iNKT CD4+, CD8+ e DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 no sangue periférico de pacientes com estágio I/II foram comparados àsquelas com estágio III/IV de endometriose.

Das 46 pacientes com endometriose 11 (23,4%) tiveram a doença classificada em estágio I/II e 35 (76,6%) em estágio III/IV. Entretanto, só foi possível detectar as frequências das células iNKT CD4+/IL6, iNKT CD4+/IL10, iNKT CD4+/IL17, iNKT CD8+/IL6, iNKT CD8+/IL10, iNKT CD8+/IL17 em uma das pacientes com estágio I/II de endometriose. Da mesma forma, não foi possível medir as frequências das células iNKT DN/IL6, iNKT DN/IL10, iNKT DN-/IL17 em nenhuma das pacientes com endometriose estágio I/II. Nos casos em que os cálculos estatísticos puderam ser realizados de forma adequada, não foi observada diferença significativa nas frequências das células avaliadas e o estágio da endometriose profunda (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo estágio I/II ou III/IV da doença nas pacientes com endometriose profunda

4.5 Avaliação das células iNKT nas diferentes fases do ciclo menstrual

Por fim, foi investigado a influência da fase do ciclo menstrual nas células iNKT assim como nos seus subtipos analisados neste estudo. Foram comparadas as frequências das células iNKT, subtipos iNKT CD4+, iNKT DN com a expressão de marcadores CCR7 e CD25, assim como dos subtipos de células iNKT CD4+, iNKT CD8+ e iNKT DN secretoras de IL-6, IL-10 e IL-17 no sangue periférico de pacientes das pacientes com endometriose profunda versus pacientes sem endometriose em cada fase do ciclo menstrual separadamente.

Realizamos ainda a comparação das frequências das mesmas células descritas acima dentro de cada grupo isoladamente comparando a fase proliferativa com a fase secretora. Portanto, comparamos dentro do grupo controle as frequências das células iNKT e subtipos entre as pacientes que se encontravam na fase proliferativa com aquelas que se encontravam na fase secretora ao momento da cirurgia. De forma idêntica realizamos a comparação dentro do grupo de pacientes com endometriose profunda.

Os resultados identificaram que pacientes na fase secretora com endometriose profunda apresentaram uma menor frequência células iNKT quando comparadas as pacientes sem a doença na mesma fase do ciclo menstrual. Entre as pacientes que se encontravam na fase proliferativa foram observadas duas diferenças significativas. As células iNKT CD4+ CD25 apresentaram uma maior frequência nas pacientes com endometriose profunda quando comparadas as pacientes do grupo controle. No entanto,

as células iNKT CD4+ DN foram identificadas em menor frequência nas pacientes com endometriose quando comparadas as pacientes sem endometriose. No grupo de pacientes com endometriose profunda identificamos uma maior frequência das células iNKT DN CD25 na fase proliferativa quando comparada com a fase secretora (tabela 8). Além disso, na fase secretora do ciclo menstrual, encontramos menor frequência de células iNKT DN IL17+ nas pacientes com endometriose profunda quando comparadas as pacientes do grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Descrição das médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa (grupo endometriose) e sem endometriose (grupo controle) e a fase do ciclo menstrual. Resultado da comparação entre os grupos e entre as fases do ciclo menstrual

Variável	Fase do ciclo menstrual	Grupo		p
		Controle	Endometriose	
iNKT	Proliferativa	0,07 (0,02; 0,56)	0,04 (0; 0,19)	0,128
	Secretora	0,25 (0,01; 0,94)	0,05 (0; 3,61)	0,030
	<i>p</i>	0,295	0,880	
iNKT CD4+	Proliferativa	31,1 (7,2; 73,1)	30,1 (0; 100)	0,734
	Secretora	28,6 (0; 69,6)	34,1 (0; 81,1)	0,747
	<i>p</i>	0,936	0,479	
iNKT CD4+/CCR7	Proliferativa	41,3 (0; 83,1)	53,8 (0; 77,5)	0,470
	Secretora	0 (0; 92,3)	40,6 (0; 83,5)	0,460
	<i>p</i>	0,316	0,368	
iNKT CD4+/CD25	Proliferativa	33,2 (0; 58,6)	44,6 (0; 60)	0,022
	Secretora	25,6 (0; 57,7)	30 (0; 81,7)	0,555
	<i>p</i>	0,674	0,121	
iNKT DN	Proliferativa	55,8 (23,1; 87,5)	28,8 (0; 73,3)	0,011
	Secretora	53,1 (0; 69,2)	30,6 (0; 81,7)	0,357
	<i>p</i>	0,611	0,542	
iNKT DN/CCR7	Proliferativa	0,5 (0; 36,6)	4,27 (0; 48,6)	>0,999
	Secretora	0,1 (0; 45,5)	6,9 (0; 60)	0,745
	<i>p</i>	0,689	0,897	
iNKT DN/CD25	Proliferativa	46,2 (0; 76,2)	62,5 (0; 100)	0,101
	Secretora	17 (0; 72,3)	37,3 (0; 87,5)	0,722
	<i>p</i>	0,437	0,032	
iNKT CD4+/IL6	Proliferativa	4,17 (0; 14,9)	0 (0; 1,89)	0,250
	Secretora	2,98 (1,13; 4,83)	1,59 (0; 6,19)	0,667
	<i>p</i>	0,857	0,543	
iNKT CD4+/IL10	Proliferativa	3,01 (0; 7,46)	1,82 (0; 3,77)	0,571
	Secretora	2,32 (1,93; 2,71)	3,31 (0; 20)	0,400
	<i>p</i>	0,381	0,260	
iNKT CD4+/IL17	Proliferativa	14,8 (8,3; 16)	8,6 (3,8; 16,4)	0,786
	Secretora	11,7 (6,6; 16,9)	9,8 (0; 17,5)	0,711
	<i>p</i>	>0,999	>0,999	
iNKT CD8+/IL6	Proliferativa	4,52 (0; 16,8)	0 (0; 10,7)	0,571
	Secretora	5,74 (1,27; 10,2)	0,8 (0; 10)	0,308
	<i>p</i>	>0,999	0,808	

continua

Tabela 8 (conclusão) - Descrição das médias das frequências de células iNKT e subtipos no sangue periférico segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa (grupo endometriose) e sem endometriose (grupo controle) e a fase do ciclo menstrual. Resultado da comparação entre os grupos e entre as fases do ciclo menstrual

Variável	Fase do ciclo menstrual	Grupo		p
		Controle	Endometriose	
iNKT CD8+/IL10	Proliferativa	3,85 (1,32; 9,8)	7,14 (0; 9,52)	>0,999
	Secretora	2,68 (2,53; 2,82)	3,01 (0; 11,1)	0,923
	<i>p</i>	0,857	0,639	
iNKT CD8+/IL17	Proliferativa	6,15 (4,07; 17,6)	13,3 (9,52; 14,3)	0,250
	Secretora	10,8 (9,6; 12)	3,95 (0; 54,5)	0,308
	<i>p</i>	0,381	0,139	
iNKT DN/IL6	Proliferativa	1,28 (0; 7,66)	2,27 (0; 3,45)	0,786
	Secretora	0,61 (0,48; 3,57)	0 (0; 1,96)	0,217
	<i>p</i>	>0,999	0,142	
iNKT DN/IL10	Proliferativa	0,52 (0; 1,02)	0 (0; 2,27)	>0,999
	Secretora	0,19 (0; 0,3)	0 (0; 2,44)	0,573
	<i>p</i>	0,571	0,836	
iNKT DN/IL17	Proliferativa	10,2 (5,2; 13,9)	13,6 (3,2; 13,8)	>0,999
	Secretora	14 (8,1; 21,4)	7,1 (0; 13,8)	0,049
	<i>p</i>	0,393	0,446	

Teste Mann-Whitney; Dados expressos como mediana (mín.; máx.).

Fase secretora

Porcentagem de células iNKT

Controles saudáveis Endometriose

* p=0,030

Gráfico 9 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e grupo controle na fase secretora do ciclo menstrual

No Quadro 3 podemos observar a distribuição das frequências de células iNKT CD4⁺ CD25⁺ e iNKT DN na fase proliferativa em pacientes com endometriose e grupo controle, iNKT DN CD25⁺ em pacientes com endometriose profunda na fase proliferativa e secretora do ciclo menstrual e iNKT DN IL17⁺ na fase secretora em pacientes com endometriose e grupo controle (Quadro 3).

Quadro 3 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células (A) iNKT CD4⁺ CD25⁺ na fase proliferativa em pacientes com endometriose e grupo controle; (B) iNKT DN na fase proliferativa em pacientes com endometriose e grupo controle; (C) iNKT DN CD25⁺ em pacientes com endometriose profunda na fase proliferativa e secretora do ciclo menstrual; (D) iNKT DN IL17⁺ na fase secretora em pacientes com endometriose e grupo controle

4.7 Avaliação das células iNKT nas lesões de endometriose

Para avaliar a possível relação entre do número de células iNKT tecidual e a endometriose realizamos análise por imunocoloração confocal dessas células no tecido com lesão de endometriose comparando com o tecido saudável, sem endometriose, adjacente (Figura 6).

Figura 6 - Imunocoloração confocal de células iNKT em lesões de endometriose. (A) Mesclagem representativa de células coradas marcadas com CD3 (vermelho), CD1D (verde), CD4 (amarelo) e DAPI (azul) de áreas saudáveis e áreas de endometriose. (B) Porcentagem de células iNKT em áreas saudáveis e endometriose do tecido (n = 9)

No Gráfico 10 podemos observar que não houve diferença estatística nas médias das frequências de células iNKT e células CD3+ no tecido com lesão de endometriose e tecido normal sem lesão de endometriose (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Representação em dotplot da distribuição das frequências das células iNKT e células CD3+ no tecido com lesão de endometriose e tecido normal sem lesão de endometriose

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

O papel do sistema imunológico na patogênese da endometriose foi amplamente demonstrado nas últimas décadas. Estudos anteriores observaram que diversas citocinas podem ser anormalmente expressas ou produzidas em pacientes com endometriose (Bergqvist et al., 2001; Bedaiwy et al., 2002; Cheong et al., 2002; Berkkanoglu; Arici, 2003; Kyama et al., 2006; Kalu et al., 2007; Othman et al., 2008; Salmassi et al., 2008; Ahn et al., 2015, Thiruchelvam et al., 2015; Monsanto et al., 2016; Miller et al., 2017). Da mesma forma, o comportamento variável da resposta Th1, Th2 e Th17 foi observado por alguns autores em mulheres com endometriose (Antsiferova et al., 2005; Podgaec et al., 2007; Fairbanks et al., 2009; Podgaec et al., 2010; Szymanowski et al., 2013; Osuga et al., 2016). Outros estudos demonstraram atividade irregular ou diferente em componentes celulares do sistema imunológico como macrófagos, linfócitos T e B, células NK e células dendríticas nas pacientes com endometriose (Berkkanoglu. Arici, 2003; Kyama et al., 2006; Dias Jr et al., 2012; Capobianco, Rovere-Querini, 2013; Ahn et al., 2015; Thiruchelvam et al., 2015). Considerando as diversas alterações no sistema imunológico previamente observadas na endometriose e ainda o importante papel das células iNKT na resposta imune (Bendelac et al., 2007; Balato et al., 2009), decidimos avaliar se as células iNKT estão alteradas em pacientes com endometriose.

O estudo foi realizado com dois grupos distintos de pacientes, um formado por portadoras de endometriose profunda e o outro por pacientes sem endometriose. A escolha do grupo de pacientes especificamente com endometriose profunda se deve a alguns fatores: a maior parte das pacientes com indicação para cirurgia no serviço é portadora de lesão profunda infiltrativa e para se evitar o viés de colocar no mesmo grupo pacientes com diferentes tipos de lesão de endometriose. O grupo controle foi composto apenas por pacientes submetidas à laqueadura tubária bilateral laparoscópica por três razões: fertilidade prévia comprovada, indicação cirúrgica não relacionada a patologias pélvicas e possibilidade de confirmar a ausência de lesões de endometriose pela laparoscopia.

Os grupos de estudo foram equivalentes em relação às características basais dos pacientes, como idade e fase do ciclo menstrual. No entanto, foi observado um IMC médio maior no grupo controle do que nas pacientes com endometriose profunda. Esse resultado está de acordo com achados de pesquisas anteriores em que o IMC médio observado foi menor em pacientes com endometriose quando comparados a mulheres saudáveis sem endometriose (Backonja et al., 2017; Liu; Zhang, 2017).

O número de pacientes com dismenorréia intensa ($EVA \geq 7$) e sintomas intestinais foi significativamente superior no grupo com endometriose profunda. Esse achado é considerado normal e esperado em função das características clínicas da endometriose cujos sintomas de dor pélvica intensa são frequentes, em especial a dismenorréia, com prevalência entre 50% a 90% entre as portadoras da doença. (Giudice et al., 2010).

Nos resultados desta pesquisa encontramos uma frequência significativamente menor de células iNKT no sangue periférico de pacientes com endometriose profunda em comparação com mulheres sem endometriose. Frequências diminuídas de células iNKT foram previamente descritas em diferentes doenças, tais como, infecção por HIV e HTLV e imunodeficiência comum variável (Fulcher et al., 2009; Ndhlovu et al., 2009; Snyder-Cappiobe et al., 2009). Outros estudos observaram que defeitos seletivos na quantidade de células iNKT e produção de citocinas estão presentes em indivíduos afetados por diferentes doenças, como diabetes tipo I, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, cirrose biliar primária, asma alérgica, esclerose múltipla, vírus da imunodeficiência humana-1 e tuberculose pulmonar (Yanagihara et al., 1999; Oishi et al., 2001; van der Vliet et al., 2002; Chan et al., 2003; Lin et al., 2005; Snyder-Cappione et al., 2007; Fletcher e Baxter, 2009). Entretanto, o tipo de ação (patogênico ou protetor) das células iNKT é bastante complexo, variável e dependente de fatores como: momento da ativação, tipo de estímulo recebido, interação com diferentes células dendríticas e perfil de citocinas secretadas.

Diante da relação entre diminuição das células iNKT e a endometriose, procuramos entender de que forma a alteração destas células estaria envolvida no desenvolvimento, manutenção ou evolução da doença. Sabemos por estudos anteriores que a endometriose está associada a alterações na distribuição de linfócitos, nas células NK e nas respostas imunes Th1, Th2 e Th17 que levam a modificações na liberação de citocinas (Nap et al., 2004; Agic et al., 2006; Martinez et al., 2007, Podgaec et al.,

2007). Por outro lado, as células iNKT, quando estimuladas e dependendo no tipo de estímulo, tem a propriedade de secretar grandes quantidades de citocinas com padrão Th1, Th2 e Th17 (Taniguchi et al., 2003; Kronenberg, 2005; Au-Yeung; Fowell, 2007; Bendelac et al., 2007; Michel et al., 2007).

Aggarwal et al., em 2014 avaliaram a atividade citolítica das células NK e iNKT e citocinas de resposta Th1 e Th2 em pacientes com artrite reumatoide (AR). Os autores observaram uma diminuição da significativa na frequências das células iNKT nas pacientes com AR comparados aos controles saudáveis ($p < 0,001$). Além disso, encontraram aumento de expressão nas células iNKT das citocinas Th1 pró-inflamatórias $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-8 e IL-18 e diminuição da citocina Th2 anti-inflamatória IL-4 em pacientes com AR. Outro achado relevante foi a relação direta entre o aumento das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ e IL-18 e a diminuição da IL-4 com a gravidade da doença.

Alterações das células iNKT também tem papel relevante no Lupus Eritematoso Sistemico (LES). As células iNKT estão diminuídas em frequência e em número absoluto em pacientes com LES. Como consequência há também nesses casos um desequilíbrio na relação Th1/Th2, aumento na secreção de IL-17, alteração na supressão da produção de auto-anticorpos e na função das células dendríticas, com implicação relevante na imunorregulação da doença (Chen et al., 2015).

Portanto, as alterações na frequência de células iNKT, neste caso a diminuição, podem alterar ou polarizar o perfil de resposta imune com aumento ou diminuição na secreção de determinadas citocinas pró-

inflamatórias ou anti-inflamatórias que podem ser relacionadas ao desenvolvimento, manutenção e evolução da endometriose.

Outro aspecto relevante é a possível influência da fase do ciclo menstrual no sistema imune especialmente nos órgãos reprodutivos. Estrogênio e progesterona são suficientes para controlar várias das funções endometriais, regulando a expressão de milhares de genes durante o ciclo menstrual (Bulun, 2009). Um perfil diferente nas frequências de células inflamatórias e secreção de citocinas é observado no sangue periférico, no líquido peritoneal e na urina de mulheres com endometriose, dependendo da fase do ciclo menstrual (Whitcomb et al., 2014; Sikora et al., 2015; Rakhila et al., 2016). Esses dados sugerem um papel importante dos hormônios esteróides sexuais na fisiologia do microambiente imunológico (Whitcomb et al., 2014; Sikora et al., 2015; Rakhila et al., 2016). A importância do estrogênio no desenvolvimento e manutenção da endometriose está bem estabelecida (Zhao et al., 2015).

Mostramos, no presente estudo, que as células iNKT ainda estão diminuídas na fase secretora no grupo de pacientes com endometriose profunda em comparação com aquele de pacientes sem endometriose. Essa diferença pode estar relacionada a anormalidades na secreção ou ação da progesterona em pacientes com endometriose (Patel, 2017; Patel, 2018). A resistência do receptor de progesterona é um dos fatores que tem sido relacionado ao desenvolvimento e manutenção da endometriose (Patel 2017; Patel 2018). Anormalidades na fisiologia da progesterona estão diretamente ligadas a modificações no ambiente imune no endométrio tóxico

e ectópico. Portanto, supomos que as células iNKT diminuídas em pacientes com endometriose podem estar relacionadas à disfunção da progesterona frequentemente associada à doença.

No mesmo contexto, nós indagamos se os subtipos de células iNKT estarão diminuídos na doença. Observamos uma diminuição dos subtipos iNKT DN, os mais predominantes em humanos e que apresentam funções efetoras importantes durante a resposta imune (Gumperz et al., 2002; Lee et al., 2002).

Questionamos ainda se as células iNKT poderiam expressar outros marcadores de superfície, como os marcadores de ativação. Lee et al. 2002, mostraram que os subtipos de células iNKT CD4+ em indivíduos saudáveis expressam exclusivamente cadeia alfa da interleucina 2 (CD25). Neste estudo demonstramos que as células iNKT DN expressaram CD25 com maior frequência na fase proliferativa comparado à fase secretora de pacientes com endometriose profunda. Em contrapartida, não foi observado esse mesmo resultado em relação à expressão de CD25 pelas células iNKT CD4+. Estes resultados demonstraram que pacientes com endometriose têm subgrupos iNKT DN regulados e mostram um perfil regulatório na fase proliferativa da endometriose.

Aspectos relacionados ao perfil hormonal das fases do ciclo menstrual, ação hormonal normal ou anormal (secreção, mutações de receptores, resistência à progesterona) e resposta imune à estimulação hormonal podem ter um papel nas variações observadas nessas células. Além disso, a homogeneidade entre os grupos estudados no ciclo menstrual

é essencial para evitar erros e resultados falsos. Os dados basais do presente estudo mostram frequência semelhante de pacientes em fase proliferativa e secretora entre a endometriose e o grupo controle.

Nosso estudo também comparou as frequências de células iNKT no sangue periférico de acordo com os sintomas de endometriose (dismenorréia, dispareunia, dor pélvica acíclica, alterações intestinais cíclicas, alterações urinárias cíclicas) e estado de fertilidade. Identificamos diminuição das células iNKT CD4⁺ CCR7⁺ em pacientes com endometriose e dismenorreia intensa (EVA $\geq$ 7). As evidências sugerem que cada subpopulação de células iNKT (CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻) produz um perfil de citocinas e ativação de células NK e B levando a uma resposta Th diferente (Lin et al., 2006). O'Reilly et al., 2011, observaram um padrão de secreção diverso de citocinas IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a e IL-22 após estimulação de células iNKT CD4⁺, CD8⁺ e iNKT CD4⁻ CD8⁻. Vários estudos demonstraram que a frequência e as funções de subtipos de células iNKT foram observadas em pacientes com diferentes doenças (Araki et al., 2003; Kenna et al., 2003; Montoya et al., 2007; Im et al., 2008; Bricard et al., 2009; Laganà et al., 2016).

As células iNKT DN possuem um importante padrão Th1, liberando maiores quantidades de IFN γ e TNF α após a estimulação (Liao et al., 2011). Neste aspecto, nossos resultados atuais demonstram uma porcentagem diminuída de iNKT DN em pacientes com endometriose. Como as células iNKT DN produzem uma resposta Th1, como o equilíbrio Th1 / Th2 é

essencial para a homeostase imune e como as irregularidades Th1 / Th2 são observadas em pacientes com endometriose, é plausível supor uma implicação dessa anormalidade na fisiopatologia da endometriose (Antsiferova et al., 2005; Podgaec et al., 2007; Fairbanks et al., 2009; Podgaec et al., 2010; Liao et al., 2011; Szymanowski et al., 2013). No entanto, neste estudo, não foi possível demonstrar o perfil Th1 (IFN γ e TNF α) em células iNKT DN ou em outros subtipos. No entanto, demonstramos que as células iNKT DN secretam citocinas IL-17 em menor proporção em pacientes com endometriose quando comparadas com mulheres sem endometriose. Foi observado também que estas células ainda estão diminuídas na fase secretora em pacientes com endometriose profunda.

Por outro lado, mostramos um aumento na frequência de células iNKT CD4 $^{+}$ IL17 $^{+}$ em pacientes com endometriose e dismenorréia intensa (EVA $\geq$ 7) versus dismenorréia leve (EVA $<$ 7). Além disso, observou-se um aumento da frequência de células iNKT CD4 $^{+}$ IL17 $^{+}$ em pacientes com endometriose e dor pélvica acíclica intensa (EVA $\geq$ 7) em comparação com pacientes com dor pélvica acíclica leve (EAV $<$ 7). A dismenorreia é o sintoma mais comum relacionado à endometriose. O número de linfócitos T CD4 $^{+}$ e os níveis de IL-17 estão relacionados ao mecanismo de dor na condição inflamatória. A interleucina-17 é um membro de uma família de citocinas, que são predominantemente produzidas por células T CD4 $^{+}$ ativadas. A IL-17 possui potentes propriedades pró-inflamatórias e está envolvida na modulação da resposta imune em distúrbios inflamatórios e dor

(Iwakura et al., 2011; Sun et al., 2017). Estudos anteriores mostraram que níveis aumentados de IL-17 estão implicados na dor visceral e neuropática (Noma et al., 2011; Day et al., 2014). Demonstrou-se que o comportamento associado à dor está reduzido em camundongos após bloqueio da produção de IL-17 em modelos inflamatórios em nervos plantar ou isquiático e em modelos de lesão em nervos periféricos (Meng et al., 2013; Knier et al., 2015).

As frequências anormais de iNKT CD4⁺ IL17⁺ observadas em nossos resultados podem ser, em parte, uma possível explicação para os sintomas de dor relacionados à endometriose. Como a frequência de células iNKT neste estudo não foi influenciada de acordo com os diferentes estágios da doença, é plausível pensar em uma provável homogeneidade na frequência das células iNKT, independente de algumas características da doença. A diferença observada na frequência de células iNKT em pacientes com endometriose pode desempenhar um papel relevante no diagnóstico da doença, uma vez que as células podem ser um marcador potencial para a presença de endometriose ou alguns tipos de lesões de endometriose como a endometriose profunda infiltrativa.

Em conjunto, os resultados de nosso estudo e o conhecimento prévio sobre a relação entre o sistema imune e a endometriose nos levam a supor que as células iNKT e seus subtipos podem desempenhar um papel importante na patogênese dessa doença. Anormalidades na frequência de células iNKT podem prejudicar o bom funcionamento do sistema

imunológico, permitindo a implantação e proliferação de lesões endometriose.

As células iNKT também podem ter uma importância no tratamento da endometriose. Uma vez que outros estudos demonstraram recentemente um efeito positivo da imunoterapia pela ativação de células iNKT com diferentes antígenos na doença hepática, doenças autoimunes como AR e LES e terapia antitumoral, existe uma possibilidade real no uso desta forma de tratamento para outras doenças inflamatórias como endometriose (Subleski et al., 2011; Ghinnagow et al., 2017).

As células iNKT têm um papel importante na homeostase imunológica e podem ser uma peça essencial no quebra-cabeça desta doença enigmática chamada endometriose. Os resultados do nosso estudo podem contribuir para o entendimento da fisiopatologia da endometriose e podem auxiliar no desenvolvimento de novos agentes diagnósticos e terapêuticos. Mais estudos são necessários para se chegar a conclusões definitivas a respeito do papel das células iNKT na endometriose.

6 Conclusões

6. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu as seguintes conclusões:

Pacientes com endometriose profunda tem a frequência de células iNKT, iNKT DN e iNKT DN IL17+ diminuída em relação às pacientes sem endometriose.

A frequência das células iNKT não estão alteradas nas pacientes com endometriose profunda em relação aos sintomas de clínicos da doença.

A frequência das células iNKT CD4+ CCR7+ encontra-se diminuída em pacientes com endometriose profunda e dismenorréia intensa.

A frequência das células iNKT CD4+ IL17+ encontra-se aumentada em pacientes com endometriose profunda e dismenorréia intensa e diminuída em pacientes com dor pélvica acíclica intensa em relação àquelas com dor pélvica acíclica leve.

Não existe diferença nas frequências das células iNKT e os subtipos estudados em relação ao estágio da endometriose I/II ou III/IV.

A fase secretora do ciclo menstrual está associada a menor frequência de células iNKT e iNKT DN IL17+ nas pacientes com endometriose profunda.

As células iNKT CD4+ CD25+ e iNKT DN encontram-se com menor frequência na fase proliferativa do ciclo menstrual em comparação com os controles.

As células iNKT DN CD25+ estão diminuídas na fase secretora em comparação a fase proliferativa nas pacientes com endometriose profunda.

7 Anexos

7. ANEXOS

Anexo 1 - Parecer consubstanciado do comitê de ética e pesquisa com aprovação do estudo.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS CELULAS NKT EM PACIENTES COM ENDOMETRIOSE

Pesquisador: Mauricio Simões Abrão

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 5

CAAE: 01514112.6.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 235.869

Data da Relatoria: 06/03/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto relacionado à patogênese da endometriose, doença com descrição de alterações da resposta imune em ambiente peritoneal pélvico. Os autores irão avaliar a presença de células NKT no sangue e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose intestinal e irão comparar esses resultados com os mesmos fluidos coletados de mulheres sem a doença.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto pretende expandir os resultados de estudo piloto que demonstrou existir uma diferença considerável entre a quantidade de células NKT no soro e no fluido peritoneal entre pacientes com e sem endometriose. Baseando-se nisso, os autores investigarão este achado em um maior número de amostras, relacionando-o

com parâmetros clínicos e histológicos da endometriose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado, os procedimentos do estudo não trazem riscos adicionais significativos e o benefício se concentra em entender melhor a patogênese da endometriose, ao analisar células ainda não estudadas na doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as considerações e sugestões foram corrigidas, tanto no projeto, quanto no TCLE

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo 1 (Cont.) - Parecer consubstanciado do comitê de ética e pesquisa com aprovação do estudo.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as considerações e sugestões foram corrigidas, tanto no projeto, quanto no TCLE

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o Item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 03 de Abril de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: marda.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com endometriose.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :

SEXO M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: . / .

ENDEREÇO:

Nº . APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL: .

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:

SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: . / .

ENDEREÇO:

Nº:..... APTO:.....

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS iNKT EM
PACIENTES COM ENDOMETRIOSE”**

PESQUISADOR: MAURICIO SIMÕES ABRÃO

CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR DOUTOR - INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
.CRM-SP: 52842

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☒

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03 ANOS

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

1 – A endometriose é uma doença ginecológica que acontece quando o tecido da parte interna do útero (endométrio) se espalha em outros órgãos e regiões do abdômen, tais como: ovário, intestino, bexiga e peritôneo. Essa doença pode causar dores intensas no abdômen, principalmente cólicas no período menstrual, prejudicando muito a qualidade de vida das mulheres portadoras de endometriose.

2 - A Senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa que tem como objetivo verificar a presença de células que possam ser importantes na endometriose. A análise será feita em uma pequena quantidade de líquido presente no abdome e em uma pequena quantidade de sangue. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

3 – Neste estudo, não serão realizados procedimentos experimentais.

4 - Será realizado procedimento rotineiro de coleta de sangue venoso (30 ml) no antebraço imediatamente antes do início do ato cirúrgico, esta coleta é igual à coleta de sangue para exames laboratoriais comuns. A coleta do líquido peritoneal (líquido que se encontra livre no interior do abdome) será realizada no início da cirurgia por meio de aspiração com seringa conectada a uma cânula de aspiração. Não há necessidade de puncionar ou penetrar com a cânula em qualquer órgão ou tecido para coleta do líquido peritoneal. A cirurgia é **indicada para diagnóstico e tratamento da endometriose**. A cirurgia será realizada por videolaparoscopia (cirurgia realizada por 3 a 4 pequenos orifícios de 5mm a 10mm de diâmetro) em que será feita uma avaliação minuciosa da cavidade e órgãos pélvicos e abdominais e identificação das lesões de endometriose. Caso seja necessário pode haver mudança no local e tamanho das incisões por necessidade técnica da cirurgia. Os dados do seu prontuário médico, referentes a esta internação, também serão consultados.

5 – Não se espera que haja qualquer efeito adverso adicional para a paciente, além do risco mínimo da coleta de sangue (pequeno hematoma no local da punção no antebraço) e dos riscos da própria cirurgia, quando também será coletado o fluido peritoneal. A coleta do líquido peritoneal não acrescenta risco adicional à realização da cirurgia.

6 – Não há benefício direto para o participante: Trata-se de estudo testando a hipótese de que poderemos identificar células que possivelmente estejam envolvidas na progressão da endometriose. Somente, ao final do estudo, poderemos concluir algum benefício para a paciente, ou seja, conhecer melhor a doença e posteriormente contribuir para a escolha do melhor tratamento.

7 – Não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais a paciente possa optar.

8 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Frederico José Silva Corrêa, que pode ser encontrado no endereço (Hospital das Clínicas – Av. Dr. Enéas de Carvalho, 255 – Divisão de Clínica Ginecológica, 10º andar, sala 10.166 – São Paulo/SP, Tel.(11) 2661-6647. 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 – 5º andar, tel: (11) 2661-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: (11) 2661-6442 – ramal 26. E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

9 – 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.

10 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente.

11 – A paciente tem o direito de se manter atualizada sobre todos os resultados parciais da pesquisa.

12 – 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.

13 – Os dados obtidos e o material coletado serão utilizados somente para o estudo em questão.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS iNKT EM PACIENTES COM ENDOMETRIOSE”**.

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 ao tratamento hospitalar quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o desenvolvimento deste, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Dr. Frederico José Silva Corrêa

Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes sem endometriose.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :

SEXO M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: . / .

ENDEREÇO:

Nº . APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL: .

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:

SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: . / .

ENDEREÇO:

Nº:..... APTO:.....

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS iNKT
EM PACIENTES COM ENDOMETRIOSE”**

PESQUISADOR: MAURÍCIO SIMÕES ABRÃO

CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR DOUTOR INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
.CRM-SP: 52842

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

☐

RISCO MÉDIO

☒

RISCO BAIXO

☐

RISCO MAIOR

☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03 ANOS

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

1 – A endometriose é uma doença ginecológica que acontece quando o tecido da parte interna do útero (endométrio) se espalha em outros órgãos e regiões do abdômen, tais como: ovário, intestino, bexiga e peritôneo. Essa doença pode causar dores intensas no abdômen, principalmente cólicas no período menstrual, prejudicando muito a qualidade de vida das mulheres portadoras de endometriose.

2 - A Senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa que tem como objetivo verificar a presença de células que possam ser importantes na endometriose. A análise será feita em uma pequena quantidade de líquido presente no abdome e em uma pequena quantidade de sangue. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

3 – Neste estudo, não serão realizados procedimentos experimentais.

4 - Será realizado procedimento rotineiro de coleta de sangue venoso (30 ml) no antebraço imediatamente antes do início do ato cirúrgico, esta coleta é igual à coleta de sangue para exames laboratoriais comuns. A coleta do líquido peritoneal (líquido que se encontra livre no interior do abdome) será realizada no início da cirurgia por meio de aspiração com seringa conectada a uma cânula de aspiração. Não há necessidade de puncionar ou penetrar com a cânula em qualquer órgão ou tecido para coleta do líquido peritoneal. A cirurgia é **indicada para laqueadura tubária bilateral (ligadura das trompas)** A cirurgia será realizada por videolaparoscopia (cirurgia realizada por 3 a 4 pequenos orifícios de 5mm a 10mm de diâmetro) em que será feita uma avaliação minuciosa da cavidade e órgãos pélvicos e abdominais e identificação de possíveis lesões e ligadura das trompas. Caso seja necessário pode haver mudança no local e tamanho das incisões por necessidade técnica da cirurgia. Os dados do seu prontuário médico, referentes a esta internação, também serão consultados.

5 – Não se espera que haja qualquer efeito adverso adicional para a paciente, além do risco mínimo da coleta de sangue (pequeno hematoma no local da punção no antebraço) e dos riscos da própria cirurgia, quando também será coletado o fluido peritoneal. A coleta do líquido peritoneal não acrescenta risco adicional à realização da cirurgia.

6 – Não há benefício direto para o participante: Trata-se de estudo testando a hipótese de que poderemos identificar células que possivelmente estejam envolvidas na progressão da endometriose. Somente no final do estudo poderemos concluir algum benefício para a paciente, ou seja, conhecer melhor a doença e posteriormente contribuir para a escolha do melhor tratamento.

7 – Não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais a paciente possa optar.

8 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Frederico José Silva Corrêa, que pode ser encontrado no endereço (Hospital das Clínicas – Av. Dr. Enéas de Carvalho, 255 – Divisão de Clínica Ginecológica, 10º andar, sala 10.166 – São Paulo/SP, Tel.(11) 2661-6647. 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 – 5º andar, tel: (11) 2661-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: (11) 2661-6442 – ramal 26. E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

9 – 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.

10 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente.

11 – A paciente tem o direito de se manter atualizada sobre todos os resultados parciais da pesquisa.

12 – 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.

13 – Os dados obtidos e o material coletado serão utilizados somente para o estudo em questão.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS iNKT EM PACIENTES COM ENDOMETRIOSE”**.

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.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Dr. Frederico José Silva Corrêa

Anexo 4 - 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 sugerir o paciente.

Anexo 5 - Tabela com a descrição e comparação das médias das frequências das células iNKT e subtipos avaliados, no sangue periférico, segundo grupos de pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sem endometriose e resultado da comparação entre os grupos. Resultados com média e desvio padrão.

Variável	Grupo		p
	Controle (N = 26)	Endometriose (N = 47)	
iNKT	0,23 ± 0,25	0,17 ± 0,55	0,010
iNKT CD4+	32,2 ± 21	37 ± 27,4	0,673
iNKT CD4+/CCR7	31,6 ± 31	35,6 ± 30,6	0,439
iNKT CD4+/CD25	25,8 ± 18,5	33,5 ± 23,1	0,168
iNKT DN	48,2 ± 21,4	34,6 ± 24,5	0,020
iNKT DN/CCR7	6,76 ± 14,08	11,18 ± 15,87	0,801
iNKT DN/CD25	33,8 ± 29,8	39,7 ± 31,8	0,416
iNKT CD4+/IL6	5,55 ± 5,71	1,37 ± 1,94	0,081
iNKT CD4+/IL10	3,08 ± 2,26	4,36 ± 5,51	0,856
iNKT CD4+/IL17	13 ± 4	8,7 ± 5,5	0,160
iNKT CD8+/IL6	6,37 ± 5,8	3,44 ± 4,25	0,196
iNKT CD8+/IL10	3,81 ± 2,91	4,53 ± 3,88	0,881
iNKT CD8+/IL17	9,11 ± 4,65	10,99 ± 14,18	0,455
iNKT DN/IL6	1,99 ± 2,57	0,74 ± 1,12	0,127
iNKT DN/IL10	0,35 ± 0,39	0,44 ± 0,88	0,356
iNKT DN/IL17	11,5 ± 5	7,8 ± 4,2	0,050

Teste Mann-Whitney

Anexo 6 - Tabela com a descrição e comparação das médias das frequências das células iNKT e subtipos avaliados, no sangue periférico, em pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sintoma de dismenorréia de intensidade pela EVA < 7 ou ≥ 7 . Resultados em média e desvio padrão.

Variável	Dismenorréia		p
	< 7	≥ 7	
	(N = 17)	(N = 30)	
iNKT	0,08 $\pm$ 0,1	0,23 $\pm$ 0,69	0,538
iNKT CD4+	38,4 $\pm$ 23,6	36,1 $\pm$ 29,8	0,613
iNKT CD4+/CCR7	51 $\pm$ 21,7	26,9 $\pm$ 31,8	0,022
iNKT CD4+/CD25	31,2 $\pm$ 21,7	34,9 $\pm$ 24,3	0,547
iNKT DN	27,5 $\pm$ 23,7	39,3 $\pm$ 24,3	0,098
iNKT DN/CCR7	12,67 $\pm$ 15,57	10,27 $\pm$ 16,28	0,330
iNKT DN/CD25	48,1 $\pm$ 28,5	35 $\pm$ 33,1	0,193
iNKT CD4+/IL6	1 $\pm$ 1,17	1,61 $\pm$ 2,4	$>0,999$
iNKT CD4+/IL10	3,21 $\pm$ 2,67	5,02 $\pm$ 6,76	0,925
iNKT CD4+/IL17	4,3 $\pm$ 4	11,1 $\pm$ 4,7	0,038
iNKT CD8+/IL6	3,87 $\pm$ 5,19	3,2 $\pm$ 3,97	0,835
iNKT CD8+/IL10	5,64 $\pm$ 4,5	3,91 $\pm$ 3,63	0,461
iNKT CD8+/IL17	14,11 $\pm$ 22,78	9,26 $\pm$ 7,61	0,593
iNKT DN/IL6	0,65 $\pm$ 0,92	0,77 $\pm$ 1,25	0,867
iNKT DN/IL10	0,2 $\pm$ 0,41	0,55 $\pm$ 1,03	0,706
iNKT DN/IL17	5,4 $\pm$ 4,2	8,9 $\pm$ 4	0,246

Teste Mann-Whitney

Anexo 7 - Tabela com a descrição e comparação das médias das frequências das células iNKT e subtipos avaliados, no sangue periférico, em pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sintoma de dor pélvica acíclica de intensidade pela EVA < 7 ou ≥ 7 . Resultados em média e desvio padrão.

Variável	Dor pélvica acíclica		p
	< 7	≥ 7	
	(N = 38)	(N = 9)	
iNKT	0,19 $\pm$ 0,6	0,08 $\pm$ 0,09	0,593
iNKT CD4+	36,8 $\pm$ 27,1	38,2 $\pm$ 31,7	0,958
iNKT CD4+/CCR7	34,4 $\pm$ 30,1	42,2 $\pm$ 35,1	0,635
iNKT CD4+/CD25	32,4 $\pm$ 23,4	39,5 $\pm$ 22,9	0,493
iNKT DN	34,4 $\pm$ 25,1	36,2 $\pm$ 22,4	0,851
iNKT DN/CCR7	11,81 $\pm$ 16,94	8,07 $\pm$ 9,01	$>0,999$
iNKT DN/CD25	39,7 $\pm$ 31,8	39,9 $\pm$ 34,8	0,894
iNKT CD4+/IL6	0,74 $\pm$ 1,02	3,89 $\pm$ 3,25	0,267
iNKT CD4+/IL10	4,8 $\pm$ 6,5	3,18 $\pm$ 1,13	0,921
iNKT CD4+/IL17	7 $\pm$ 5,2	13,1 $\pm$ 3,9	0,048
iNKT CD8+/IL6	3,72 $\pm$ 4,83	2,73 $\pm$ 2,76	0,945
iNKT CD8+/IL10	5,2 $\pm$ 4,24	2,84 $\pm$ 2,44	0,454
iNKT CD8+/IL17	13,27 $\pm$ 16,36	5,31 $\pm$ 2,92	0,539
iNKT DN/IL6	0,93 $\pm$ 1,3	0,31 $\pm$ 0,35	0,710
iNKT DN/IL10	0,34 $\pm$ 0,77	0,67 $\pm$ 1,18	0,503
iNKT DN/IL17	8,3 $\pm$ 5	6,7 $\pm$ 1,3	0,503

Teste Mann-Whitney

Anexo 8 - Tabela com a descrição e comparação das médias das frequências das células iNKT e subtipos avaliados, no sangue periférico, em pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sintoma de dispareunia de intensidade pela EVA < 7 ou ≥ 7 . Resultados em média e desvio padrão.

Variável	Dyspareunia		p
	< 7	≥ 7	
	(N = 37)	(N = 10)	
iNKT	0,21 $\pm$ 0,61	0,05 $\pm$ 0,07	0,111
iNKT CD4+	38 $\pm$ 27,2	32,7 $\pm$ 29,5	0,582
iNKT CD4+/CCR7	39,2 $\pm$ 31,4	21,7 $\pm$ 23,7	0,209
iNKT CD4+/CD25	33,5 $\pm$ 23,7	33,5 $\pm$ 22,2	0,960
iNKT DN	34,4 $\pm$ 25,1	35,7 $\pm$ 23,4	0,702
iNKT DN/CCR7	13,4 $\pm$ 17,09	3,05 $\pm$ 5,22	0,092
iNKT DN/CD25	42,4 $\pm$ 32,2	29,1 $\pm$ 29,7	0,311
iNKT CD4+/IL6	1,32 $\pm$ 2,05	1,79 $\pm$ 0	0,800
iNKT CD4+/IL10	4,71 $\pm$ 6,1	2,8 $\pm$ 0,16	0,909
iNKT CD4+/IL17	8,1 $\pm$ 5	11 $\pm$ 9,2	0,582
iNKT CD8+/IL6	3,25 $\pm$ 4,26	3,92 $\pm$ 4,86	$>0,999$
iNKT CD8+/IL10	5 $\pm$ 4,25	3,34 $\pm$ 2,93	0,454
iNKT CD8+/IL17	11,05 $\pm$ 16,09	10,86 $\pm$ 9,76	0,635
iNKT DN/IL6	0,96 $\pm$ 1,2	0 $\pm$ 0	0,161
iNKT DN/IL10	0,33 $\pm$ 0,73	0,81 $\pm$ 1,41	0,811
iNKT DN/IL17	7,6 $\pm$ 4,3	8,6 $\pm$ 4,6	0,811

Teste Mann-Whitney

Anexo 9 - Tabela com a descrição e comparação das médias das frequências das células iNKT e subtipos avaliados, no sangue periférico, em pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sintoma de alteração intestinal cíclica de intensidade pela EVA < 7 ou ≥ 7 . Resultados em média e desvio padrão.

Variável	Alteração intestinal cíclica		p
	< 7	≥ 7	
	(N = 40)	(N = 7)	
iNKT	0,18 $\pm$ 0,59	0,11 $\pm$ 0,1	0,701
iNKT CD4+	34 $\pm$ 26,3	55 $\pm$ 29	0,081
iNKT CD4+/CCR7	37,6 $\pm$ 31,7	24,7 $\pm$ 22,8	0,293
iNKT CD4+/CD25	34,6 $\pm$ 23,5	27,4 $\pm$ 21,6	0,363
iNKT DN	36,9 $\pm$ 24,3	20,6 $\pm$ 22,4	0,171
iNKT DN/CCR7	12,36 $\pm$ 16,7	4,12 $\pm$ 6,5	0,297
iNKT DN/CD25	41,7 $\pm$ 32,2	28,4 $\pm$ 29,5	0,370
iNKT CD4+/IL6	0,59 $\pm$ 1,01	3,19 $\pm$ 2,6	0,183
iNKT CD4+/IL10	4,83 $\pm$ 6,49	3,11 $\pm$ 1,16	$>0,999$
iNKT CD4+/IL17	8,6 $\pm$ 6,2	8,7 $\pm$ 3,7	0,630
iNKT CD8+/IL6	2,99 $\pm$ 4,27	5,09 $\pm$ 4,63	0,291
iNKT CD8+/IL10	5,03 $\pm$ 4,17	2,67 $\pm$ 2,06	0,555
iNKT CD8+/IL17	12,83 $\pm$ 15,62	4,26 $\pm$ 0,65	0,555
iNKT DN/IL6	0,83 $\pm$ 1,26	0,41 $\pm$ 0,36	$>0,999$
iNKT DN/IL10	0,55 $\pm$ 0,98	0,08 $\pm$ 0,15	0,937
iNKT DN/IL17	7,9 $\pm$ 4,8	7,3 $\pm$ 0,4	0,811

Teste Mann-Whitney

Anexo 10 - Tabela com a descrição e comparação das médias das frequências das células iNKT e subtipos avaliados, no sangue periférico, em pacientes com endometriose profunda infiltrativa e sintoma de alteração urinária cíclica de intensidade pela EVA < 7 ou ≥ 7 . Resultados em média e desvio padrão.

Variável	Alteração urinária cíclica		p
	< 7	≥ 7	
	(N = 46)	(N = 1)	
iNKT	0,18 $\pm$ 0,55	0,03 $\pm$ 0	0,591
iNKT CD4+	36,7 $\pm$ 27,6	50 $\pm$ 0	0,714
iNKT CD4+/CCR7	34,5 $\pm$ 30,2	77,5 $\pm$ 0	0,154
iNKT CD4+/CD25	32,8 $\pm$ 23	60 $\pm$ 0	0,200
iNKT DN	34,4 $\pm$ 24,7	45 $\pm$ 0	0,698
iNKT DN/CCR7	10,27 $\pm$ 14,91	48,6 $\pm$ 0	0,143
iNKT DN/CD25	39,1 $\pm$ 32	62,5 $\pm$ 0	0,615
iNKT CD4+/IL6	1,31 $\pm$ 2,05	1,89 $\pm$ 0	0,600
iNKT CD4+/IL10	4,42 $\pm$ 5,81	3,77 $\pm$ 0	0,727
iNKT CD4+/IL17	9,1 $\pm$ 5,5	3,8 $\pm$ 0	0,545
iNKT CD8+/IL6	3,7 $\pm$ 4,31	0 $\pm$ 0	0,429
iNKT CD8+/IL10	4,14 $\pm$ 3,75	9,52 $\pm$ 0	0,286
iNKT CD8+/IL17	11,11 $\pm$ 14,76	9,52 $\pm$ 0	0,857
iNKT DN/IL6	0,61 $\pm$ 1,07	2,27 $\pm$ 0	0,308
iNKT DN/IL10	0,29 $\pm$ 0,72	2,27 $\pm$ 0	0,308
iNKT DN/IL17	7,3 $\pm$ 4	13,6 $\pm$ 0	0,462

Teste Mann-Whitney

Anexo 11 - Tabela com a descrição e comparação das médias das frequências das células iNKT e subtipos avaliados, no sangue periférico, em pacientes com endometriose profunda infiltrativa estágio I/II ou III/IV. Resultados em média e desvio padrão.

Variável	Estadio		p
	I/II (N = 11)	III/IV (N = 33)	
iNKT	0,08 ± 0,1	0,21 ± 0,63	0,574
iNKT CD4+	32,2 ± 24,9	38,4 ± 28,3	0,652
iNKT CD4+/CCR7	39,1 ± 26	34,4 ± 32,4	0,716
iNKT CD4+/CD25	37,3 ± 15,9	32,2 ± 25,2	0,770
iNKT DN	41,8 ± 21	32,2 ± 25,4	0,146
iNKT DN/CCR7	15,7 ± 16,61	9,58 ± 15,56	0,081
iNKT DN/CD25	44,8 ± 26	37,7 ± 34	0,842
iNKT CD4+/IL6	0 ± 0	1,52 ± 1,99	0,600
iNKT CD4+/IL10	6,45 ± 0	4,15 ± 5,76	0,364
iNKT CD4+/IL17	3,2 ± 0	9,2 ± 5,4	0,364
iNKT CD8+/IL6	9,09 ± 0	3 ± 4,09	0,429
iNKT CD8+/IL10	9,09 ± 0	4,17 ± 3,8	0,429
iNKT CD8+/IL17	54,5 ± 0	7,65 ± 6,93	0,143
iNKT DN/IL6		0,74 ± 1,12	
iNKT DN/IL10		0,44 ± 0,88	
iNKT DN/IL17		7,8 ± 4,2	

Teste Mann-Whitney

Anexo 12 - Dados clínicos de 47 pacientes com endometriose profunda

Nº	Idade	Raça	IMC	DM	DPA	DP	AIC	AUC	Infertilidade	Estadio	Fase ciclo
1	28	Branca	19,8	6	6	0	4	0	Sim	III/IV	Secretora
2	21	Branca	23,2	8	2	6	5	0	Sim	III/IV	Proliferativa
3	31	Branca	21,8	5	0	0	0	0	Sim	III/IV	Secretora
4	41	Branca	21,9	3	0	2	0	0	Sim	I/II	Secretora
5	41	Branca	19,6	9	0	7	9	0	Não	III/IV	Proliferativa
6	34	Parda	22,3	9	4	0	0	0	Sim	I/II	Secretora
7	33	Amarela	23,1	5	0	0	0	0	Não tentou	III/IV	Secretora
8	31	Branca	18,6	0	0	8	7	0	Sim	III/IV	Secretora
9	40	Branca	21,3	9	6	7	5	0	Sim	III/IV	Secretora
10	35	Branca	27,5	7	7	0	0	0	Sim	III/IV	Secretora
11	27	Branca	19,1	9	8	5	0	0	Não tentou	III/IV	Proliferativa
12	49	Branca	19,4	0	0	1	0	0	Não	III/IV	Proliferativa
13	36	Branca	24,3	7	0	0	4	0	Não tentou	III/IV	Proliferativa
14	36	Branca	21,1	0	0	0	0	0	Não tentou	I/II	Secretora
15	34	Branca	18,4	9	0	6	0	0	Não	III/IV	Secretora
16	32	Branca	23,8	8	0	0	0	0	Sim	III/IV	Secretora
17	35	Branca	21,9	0	0	0	0	0	Não	III/IV	Secretora
18	30	Branca	20,7	9	0	4	0	8	Sim	III/IV	Proliferativa
19	30	Branca	19,8	9	6	10	9	0	Não	III/IV	Proliferativa
20	38	Branca	17,9	0	0	0	0	0	Sim	III/IV	Secretora
21	47	Branca	22,0	7	8	7	0	0	Não tentou	III/IV	Secretora
22	29	Branca	22,1	7	0	5	0	0	Sim	III/IV	Secretora
23	39	Branca	20,8	8	5	4	0	4	Sim	III/IV	Proliferativa
24	35	Branca	20,6	9	9	9	0	0	Sim	III/IV	Secretora
25	30	Branca	22,2	9	0	0	10	0	Não tentou	III/IV	Proliferativa
26	35	Branca	24,2	10	7	0	6	5	Não tentou	III/IV	Secretora
27	25	Negra	17,7	8	6	7	0	0	Sim	I/II	Secretora
28	30	Branca	20,7	8	5	7	0	0	Sim	III/IV	Proliferativa
29	37	Branca	23,2	10	0	0	0	0	Não tentou	III/IV	Proliferativa
30	43	Branca	25,2	8	0	7	9	0	Sim	I/II	Secretora
31	29	Branca	20,3	5	0	0	0	0	Sim	I/II	Proliferativa
32	37	Negra	20,2	8	0	0	0	0	Sim	III/IV	Secretora
33	37	Branca	25,1	1	0	0	0	0	Não	III/IV	Secretora
34	37	Branca	27,2	10	0	0	3	0	Não tentou	I/II	Secretora
35	36	Branca	23,1	9	0	2	0	0	Não tentou	III/IV	Secretora
36	27	Branca	25,8	8	0	0	0	0	Não tentou	I/II	Proliferativa
37	28	Branca	18,2	4	2	0	0	0	Não tentou	I/II	Secretora
38	45	Branca	33,3	5	0	0	0	0	Não	III/IV	Proliferativa
39	45	Branca	26,1	5	0	5	0	0	Sim	I/II	Secretora
40	27	Branca	22,6	7	10	0	0	0	Não	III/IV	Secretora
41	30	Branca	23,9	3	0	2	0	0	Sim	I/II	Secretora
42	36	Amarela	22,0	8	7	0	7	0	Não tentou	III/IV	Secretora
43	38	Branca	23,2	6	3	0	0	0	Não	III/IV	Secretora
44	32	Branca	21,9	0	0	0	0	0	Sim	III/IV	Secretora
45	21	Branca	20,9	10	8	0	7	0	Sim	III/IV	Secretora
46	37	Branca	32,4	10	10	10	0	0	Sim	III/IV	Secretora
47	39	Branca	25,4	8	0	3	0	0	Sim	III/IV	Proliferativa

Anexo 13 - Dados clínicos de 26 pacientes com endometriose profunda

Nº	Idade	Raça	IMC	DM	DPA	DP	AIC	AUC	Infertilidade	Fase ciclo
1	31	Branca	26,1	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
2	34	Negra	20,4	0	0	0	0	0	Não	Secretora
3	39	Parda	24,2	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
4	35	Parda	19,4	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
5	30	Branca	20,7	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
6	25	Parda	24,6	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
7	31	Branca	25,1	0	0	0	0	0	Não	Secretora
8	35	Parda	26,1	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
9	43	Branca	23,0	6	8	8	0	0	Não	Secretora
10	43	Branca	22,3	7	5	0	0	0	Não	Secretora
11	32	Branca	21,5	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
12	36	Branca	26,8	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
13	33	Parda	24,1	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
14	35	Branca	23,6	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
15	38	Parda	28,4	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
16	37	Branca	25,7	0	0	0	0	0	Não	Secretora
17	33	Branca	30,8	0	0	0	0	0	Não	Secretora
18	36	Parda	23,6	0	0	0	0	0	Não	Secretora
19	33	Branca	21,6	0	0	0	0	0	Não	Secretora
21	33	Parda	22,9	4	0	0	0	0	Não	Secretora
22	34	Branca	20,3	0	0	0	0	0	Não	Secretora
23	44	Branca	19,8	4	5	0	5	0	Não	Secretora
24	27	Branca	21,7	10	0	0	0	0	Não	Secretora
25	30	Parda	31,1	0	0	0	0	0	Não	Proliferativa
26	32	Branca	26,4	2	0	0	0	0	Não	Proliferativa
27	39	Branca	25,4	10	10	0	5	0	Não tentou	Proliferativa

Anexo 14 – Resultado das frequências das células iNKT e subtipos de 47 pacientes com endometriose profunda.

Nº	iNKT	iNKT CD4+	iNKT CD4+/ CCR7	iNKT CD4+/ CD25	iNKT DN	iNKT DN/ CCR7	iNKT DN/ CD25	iNKT CD4+ / IL6	iNKT CD4+/ IL10	iNKT CD4+/ IL17	iNKT CD8+/ IL6	iNKT CD8+/ IL10	iNKT CD8+/ IL17	iNKT DN/ IL6	iNKT DN/ IL10	iNKT DN/ IL17
1	0,083	16,2	67,7	0	0	0,00					0	0	8,33	1,96	0	9,8
2	0,002	100	0	50	66,7	0,00	100									
3	0,000	40,9	41,3	17,63	28	0,00	28,6	0	0	0	0	11,1	0	0	0	0
4	0,102	60	55,6	27,5	37,7	6,90	34,5									
5	0,039	73	44,6	40,3	1,38	0,00	66,7									
6	0,036	16,7	0	0	50	0,00	0									
7	0,012	44,4	75	0	0	0,00										
8	0,000	53	13,6	0	0	0,00	0	1,79	2,680	4,46	10	5	5	0	0	7,14
9	0,049	40	0	0	54,3	0,00	0				0	0	25	0	0	13,8
10	0,038	52,9	79,7	70,3	45	23,80	66,7							0	0	7,14
11	0,034	67	66,7	50,3	14,9	14,30	85,7									
12	0,035	55,1	68,4	54,3	28,6	20,00	80									
13	0,031	30,3	55	44,6	22,5	22,20	66,7									
14	0,034	71,3	45,4	32,1	5,5	23,50	58,8	0	6,450	3,23	9,09	9,09	54,5			
15	0,160	60,3	0	18,2	18,2	0,00	0									
16	0,109	10,6	0	0	81,2	44,90	68,1	0	20,000	10	7,14	7,14	0	0	0	8,47
17	0,036	81,1	0	16,2	16,2	0,00	0									
18	0,033	50	77,5	60	45	48,60	62,5	1,89	3,770	3,77	0	9,52	9,52	2,27	2,27	13,6
19	0,190	18,4	0	40,3	40,3	0,00	6,9									
20	0,303	12,7	48,6	68,3	69	10,00	68,3	2,22	3,7	9,63	0,274	3,01	2,74	0,649	0,812	4,71
21	0,000					0,00			2,91	17,5	0	6,45	9,68	0	2,44	4,88
22	0,094	46,6	83,5	57,7	28,4	55,90	54,2									
23	0,047	13,3			73,3											
24	0,017	0	0	30	60	0,00	0									
25	0,159	93,6	0	0	0	0,00	0									

continua

Anexo 14 – Resultado das frequências das células iNKT e subtipos de 47 pacientes com endometriose profunda (conclusão).

Nº	iNKT	iNKT CD4+	iNKT CD4+/ CCR7	iNKT CD4+/ CD25	iNKT DN	iNKT DN/ CCR7	iNKT DN/ CD25	iNKT CD4+ / IL6	iNKT CD4+/ IL10	iNKT CD4+/ IL17	iNKT CD8+/ IL6	iNKT CD8+/ IL10	iNKT CD8+/ IL17	iNKT DN/ IL6	iNKT DN/ IL10	iNKT DN/ IL17
26	0,040	76	0	2,38	4,76	0,00	0									
27	0,000	0	11,2	53,3	30,6	8,89	53,3									
28	0,174	10,1	53,8	55,9	52,3	4,27	55,9									
29	0,061	0	0	8,35	16,7	0,00	0	0	0,000	8,57	0	0	13,3	0	0	3,23
30	0,017	66,7	50	48,3	46,7	14,30	50									
31	0,020	24,3	72,2	42,1	29,7	9,09	54,5									
32	0,851	28,2	0	5,56	5,56	0,00	0									
33	0,000	0		42,4	28,6	12,50	56,2									
34	0,030	14,8	0	31,8	61,5	0,00	0									
35	3,610	6,09	0	81,7	81,7	0,00	2,25									
36	0,096	29,9	44,8	39	29	11,50	49									
37	0,062				76,9	60,00	87,5									
38	0,070	17	65,6	47,8	15,6	0,00	80									
39	0,349	11,8	49	54,1	66,9	15,40	41,3									
40	0,151	8,18	66,7	48,4	56,8	8,00	40									
41	0,104	26,9	63,1	44,45	24,8	23,10	64,1									
42	0,247	25	39,8	35,5	35,5	10,40	47	6,19	4,420	11,5	4,46	1,91	3,82	0,585	0	7,02
43	0,111	44,7	48,7	20,8	20,8	22,20	19,4									
44	0,042	55,6			18,5											
45								1,59	2,220	10,2	0,795	1,1	3,95	0,642	0,253	7,77
46											5,66	1,89	3,77			
47								0	1,820	16,4	10,7	7,14	14,3	3,45	0	13,8

8 Referências

8. REFERÊNCIAS

ASRM, Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-21.

Abbas AL, Lichtman AH; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Educacional; 2012. 560 p.

Abrao MS, Goncalves MO, Ajossa S, Melis GB, Guerriero S. The sonographic diagnosis of deep endometriosis. *J Ultrasound Med*. 2009; 28(3):408-9;

Abrao MS, Goncalves MO, Dias JA, Jr., Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3092-7.

Abrao MS, Machado MA, Campos FG, Habr-Gama A, Pinotti HW. [Rectal endometriosis]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1994;49(4):173-6.

Adamson GD. Endometriosis classification: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011;23(4):213-20.

Aggarwal A, Sharma A, Bhatnagar A. Role of cytolytic impairment of natural killer and natural killer T-cell populations in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2014;33(8):1067-78.

Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol Obstet Invest*. 2006;62(3):139-47.

Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, Thomas R, Tayade C. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:795976.

Andreoli CG, Genro VK, Souza CA, Michelon T, Bilibio JP, Scheffel C, et al. T helper (Th)1, Th2, and Th17 interleukin pathways in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2477-80.

Antsiferova YS, Sotnikova NY, Posiseeva LV, Shor AL. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2005;84(6):1705-11.

Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol*. 2003;15(2):279-88.

Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ, Olive DL. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod*. 1996;2(1):40-5.

Arruda MS, Petta CA, Abrao MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod*. 2003;18(4):756-9.

Au-Yeung BB, Fowell DJ. A key role for Itk in both IFN gamma and IL-4 production by NKT cells. *J Immunol*. 2007;179(1):111-9.

Backonja U, Hediger ML, Chen Z, Lauver DR, Sun L, Peterson CM, Buck Louis GM. Beyond Body Mass Index: Using Anthropometric Measures and Body Composition. Indicators to Assess Odds of an Endometriosis Diagnosis. *J Womens Health (Larchmt)*. 2017;26(9):941-50.

- Bai HB, Du JZ, Zeng XX. [The autonomic nervous system involved in regulation of immune function in rats during hypoxia]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2001;17(3):224-6.
- Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*. 2009;129(7):1628-42.
- Balato A, Zhao Y, Harberts E, Groleau P, Liu J, Fischelevich R, et al. CD1d-dependent, iNKT-cell cytotoxicity against keratinocytes in allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol*. 2012;21(12):915-20.
- Balenga NA, Rafati S. Innate immune system: specific or non-specific? *Med Hypotheses*. 2007;69(2):460-1.
- Ballard K, Lowton K, Wright J. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril*. 2006;86(5):1296-301.
- Ballweg ML. Big picture of endometriosis helps provide guidance on approach to teens: comparative historical data show endo starting younger, is more severe. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2003;16(3 Suppl):S21-6.
- Barao I, Ascensao JL. Human natural killer cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1998;46(4):213-29.
- Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev*. 2013;252(1):52-77.
- Bassi MA, Podgaec S, Dias JA, Jr., D'Amico Filho N, Petta CA, Abrao MS. Quality of life after segmental resection of the rectosigmoid by laparoscopy in patients with deep infiltrating endometriosis with bowel involvement. *J Minim Invasive Gynecol*. 2011;18(6):730-3.

Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(6):1091-5.

Bazot M, Darai E. Evaluation of pelvic endometriosis: the role of MRI. *J Radiol*. 2008;89(11 Pt 1):1695-6.

Beaulieu AM, Madera S, Sun JC. Molecular Programming of Immunological Memory in Natural Killer Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2015;850:81-91.

Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, Agarwal A. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod*. 2002;17(2):426-31.

Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.

Benoist C, Mathis D. Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a007021.

Bergqvist A. Extragenital endometriosis. A review. *Eur J Surg*. 1992;158(1):7-12.

Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2003;50(1):48-59.

Bezbradica JS, Stanic AK, Matsuki N, Bour-Jordan H, Bluestone JA, Thomas JW, et al. Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 natural T cell activation in vivo. *J Immunol*. 2005;174(8):4696-705.

Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine*. 2008;75(4):373-5.

Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Pena J, et al. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*. 2002;38(9):637-60.

Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction*. 2006;132(3):501-9.

Boyson JE, Aktan I, Barkhuff DA, Chant A. NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunol Invest*. 2008;37(5):565-82.

Brandtzaeg P. The human intestinal immune system: basic cellular and humoral mechanisms. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1996;10(1):1-24.

Bricard G, Cesson V, Devevre E, Bouzourene H, Barbey C, Rufer N, et al. Enrichment of human CD4+ V(alpha)24/Vbeta11 invariant NKT cells in intrahepatic malignant tumors. *J Immunol*. 2009;182(8):5140-51.

Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, et al. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med*. 1998;188(8):1521-8.

Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009;360(3):268-79.

Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.

Campanati A, Orciani M, Consales V, Lazzarini R, Ganzetti G, Di Benedetto G, et al. Characterization and profiling of immunomodulatory genes in resident mesenchymal stem cells reflect the Th1-Th17/Th2 imbalance of psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2014;306(10):915-20.

Canchis PW, Bhan AK, Landau SB, Yang L, Balk SP, Blumberg RS. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology*. 1993;80(4):561-5.

Canis M, Bouquet De Jolinieres J, Wattiez A, Pouly JL, Mage G, Manhes H, et al. Classification of endometriosis. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1993;7(4):759-74.

Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT, et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS One*. 2010;5(9).

Chan AC, Leeansyah E, Cochrane A, d'Udekem d'Acoz Y, Mittag D, Harrison LC, et al. Ex-vivo analysis of human natural killer T cells demonstrates heterogeneity between tissues and within established CD4(+) and CD4(-) subsets. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(1):129-37.

Chan WL, Pejnovic N, Liew TV, Lee CA, Groves R, Hamilton H. NKT cell subsets in infection and inflammation. *Immunol Lett*. 2003;85(2):159-63.

Chen J, Wu M, Wang J, Li X. Immunoregulation of NKT Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res*. 2015;2015:206731.

Cheong YC, Shelton JB, Laird SM, Richmond M, Kudesia G, Li TC, Ledger WL. IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. *Hum Reprod*. 2002 Jan;17(1):69-75.

Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinoudaki I, Sioulas V, Creatsas G. Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2007;12(3):194-202.

Capobianco A, Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front Immunol*. 2013;4:9.

Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(32):11287-92.

Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril*. 1990; 53(6):978-83.

Damario MA, Rock JA. Pain recurrence: a quality of life issue in endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 1995;50 Suppl 1:S27-42.

Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:211-21.

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(3):317-24.

Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med*. 1994; 180(3):1171-6.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000a;343(1):37-49.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000b;343(2):108-17.

Dolff S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG, Abdulahad WH. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2011;141(2):197-204.

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

Fairbanks F, Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, Jr., de Oliveira RM, Rizzo LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. *Fertil Steril*. 2009;91(2):320-4.

Fassbender A, Burney RO, O DF, D'Hooghe T, Giudice L. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:130854.

Feng P, Yan R, Dai X, Xie X, Wen H, Yang S. The alteration and clinical significance of Th1/Th2/Th17/Treg cells in patients with multiple myeloma. *Inflammation*. 2015;38(2):705-9.

Ferrero S, Esposito F, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V, Ragni N. Quality of sex life in women with endometriosis and deep dyspareunia. *Fertil Steril*. 2005;83(3):573-9.

Fishelevich R, Malanina A, Luzina I, Atamas S, Smyth MJ, Porcelli SA, et al. Ceramide-dependent regulation of human epidermal keratinocyte CD1d expression during terminal differentiation. *J Immunol*. 2006;176(4):2590-9.

Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):47-59.

Fletcher MT, Baxter AG. Clinical application of NKT cell biology in type I (autoimmune) diabetes mellitus. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(4):315-23.

Forsthuber TG, Ji N. Quo vadis Th1 and Th2 cells in autoimmunity and infectious diseases: Th17 cells, the new kid on the block. *Expert Rev Clin Immunol*. 2007;3(3):251-4.

Fulcher DA, Avery DT, Fewings NL, Berglund LJ, Wong S, Riminton DS, Adelstein S, Tangye SG. Invariant natural killer (iNK) T cell deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(3):365-9.

Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(11):818-34.

Garry R. Diagnosis of endometriosis and pelvic pain. *Fertil Steril*. 2006;86(5):1307-9.

Ghinnagow R, De Meester J, Cruz LJ, Aspod C, Cognac S, Macho Fernandez E, Soulard D, Fontaine J, Chaperot L, Charles J, Soncin F, Mami-Chouaib F, Plumas J, Faveeuw C, Trottein F. Co-delivery of the NKT agonist α -galactosylceramide and tumor antigens to cross-priming dendritic cells breaks tolerance to self-antigens and promotes antitumor responses. *Oncoimmunology*. 2017;6(9):e1339855.

Gilmore SM, Aksel S, Hoff C, Peterson RD. In vitro lymphocyte activity in women with endometriosis--an altered immune response? *Fertil Steril*. 1992;58(6):1148-52.

Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2010;362(25):2389-98.

Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364(9447):1789-99.

Gmyrek GB, Sieradzka U, Goluda M, Gabrys M, Sozanski R, Jerzak M, et al. Differential flow cytometric detection of intracellular cytokines in peripheral and peritoneal mononuclear cells of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;137(1):67-76.

Gmyrek GB, Sozanski R, Jerzak M, Chrobak A, Wickiewicz D, Skupnik A, et al. Evaluation of monocyte chemotactic protein-1 levels in peripheral blood of infertile women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005;122(2):199-205.

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*. 2000;21(11):573-83.

Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004b;114(10):1379-88.

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004a;4(3):231-7.

Godfrey DI, McCluskey J, Rossjohn J. CD1d antigen presentation: treats for NKT cells. *Nat Immunol*. 2005;6(8):754-6.

Godfrey DI, Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin Immunol.* 2010;22(2):61-7.

Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo).* 2015a;13(1):153-6.

Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 2. *Einstein (Sao Paulo).* 2015b;13(1):157-62.

Gonçalves MO, Dias JA Jr., Podgaec S, Averbach M, Abrao MS. Transvaginal ultrasound for diagnosis of deeply infiltrating endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;104(2):156-60.

Gonçalves MO, Podgaec S, Dias JA, Jr., Gonzalez M, Abrao MS. Transvaginal ultrasonography with bowel preparation is able to predict the number of lesions and rectosigmoid layers affected in cases of deep endometriosis, defining surgical strategy. *Hum Reprod.* 2010;25(3):665-71.

Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med.* 2002;195(5):625-36.

Haas D, Shebl O, Shamiyeh A, Oppelt P. The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2013;92(1):3-7.

Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, et al. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol.* 1999;29(11):3768-81.

Harada T, Yoshioka H, Yoshida S, Iwabe T, Onohara Y, Tanikawa M, et al. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;176(3):593-7.

Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application. *Curr Med Chem*. 2004; 11(2):241-52.

Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology*. 2008;125(2):161-9.

Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Lee TY. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod*. 1995;10(10):2671-5.

Im JS, Kang TJ, Lee SB, Kim CH, Lee SH, Venkataswamy MM, et al. Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections. *Clin Immunol*. 2008;127(2):214-24.

Javadian A, Salehi E, Bidad K, Sahraian MA, Izad M. Effect of estrogen on Th1, Th2 and Th17 cytokines production by proteolipid protein and PHA activated peripheral blood mononuclear cells isolated from multiple sclerosis patients. *Arch Med Res*. 2014;45(2):177-82.

Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002838.

Kalu E, Sumar N, Giannopoulos T, Patel P, Croucher C, Sherriff E, et al. Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33(4):490-5.

Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, et al. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol*. 2003;171(4):1775-9.

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(10):2698-704.

Kim CH, Butcher EC, Johnston B. Distinct subsets of human V α 24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol*. 2002;23(11):516-9.

Kirkwood R, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006. 502 p.

Kralickova M, Vetvicka V. Immunological aspects of endometriosis: a review. *Ann Transl Med*. 2015;3(11):153.

Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:877-900.

Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):557-68.

Kumar V, Delovitch TL. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology*. 2014;142(3):321-36.

Kyama CM, Overbergh L, Debrock S, Valckx D, Vander Perre S, Meuleman C, Mihalyi A, Mwenda JM, Mathieu C, D'Hooghe TM. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2006 Jun;85(6):1667-75.

Laganà AS, Triolo O, Salmeri FM, Granese R, Palmara VI, Ban Frangež H, Vrtčnik Bokal E, Sofo V. Natural Killer T cell subsets in eutopic and ectopic endometrium: a fresh look to a busy corner. *Arch Gynecol Obstet*. 2016; 293(5):941-9.

Lambert S, Santulli P, Chouzenoux S, Marcellin L, Borghese B, de Ziegler D, et al. [Endometriosis: increasing concentrations of serum interleukin-1beta and interleukin-1sRII is associated with the deep form of this pathology]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2014;43(9):735-43.

Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmun Rev*. 2010;10(2):112-5.

Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med*. 2002 Mar 4;195(5):637-41.

Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):598-604.

Lin H, Nieda M, Rozenkov V, Nicol AJ. Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells. *Exp Hematol*. 2006;34(3):289-95.

Lin Y, Roberts TJ, Wang CR, Cho S, Brutkiewicz RR. Long-term loss of canonical NKT cells following an acute virus infection. *Eur J Immunol*. 2005;35(3):879-89.

Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013;138(2):105-15.

Litman GW, Rast JP, Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(8):543-53.

Liu Y, Zhang W. Association between body mass index and endometriosis risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(29):46928-36.

Luisi S, Lazzeri L, Ciani V, Petraglia F. Endometriosis in Italy: from cost estimates to new medical treatment. *Gynecol Endocrinol*. 2009;25(11):734-40.

Macho-Fernandez E, Brigl M. The extended family of CD1d-restricted NKT cells: sifting through a mixed bag of TCRs, antigens, and functions. *Front Immunol*. 2015;6:362.

Malutan AM, Drugan T, Costin N, Ciortea R, Bucuri C, Rada MP, et al. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(1):96-102.

Martinez S, Garrido N, Coperias JL, Pardo F, Desco J, Garcia-Velasco JA, et al. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(3):836-42.

Matarese G, De Placido G, Nikas Y, Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med*. 2003;9(5):223-8.

May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2010;16(6):651-74.

McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest.* 1996a;98(2):482-9.

McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1996b;11(1):220-3.

Meloni F, Solari N, Cavagna L, Morosini M, Montecucco CM, Fietta AM. Frequency of Th1, Th2 and Th17 producing T lymphocytes in bronchoalveolar lavage of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27(5):765-72.

Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med.* 2007;204(5):995-1001.

Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget.* 2017;8(4):7138-7147.

Moen MH. Is a long period without childbirth a risk factor for developing endometriosis? *Hum Reprod.* 1991;6(10):1404-7.

Monsanto SP, Edwards AK, Zhou J, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Young SL, et al. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril.* 2016; 105(4):968-77 e5.

Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122(1):1-14.

Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol*. 2002a;3(1):6-8.

Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol*. 2002b; 32(5):1205-11.

Mosmann TR CR. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.

Mueller MD, Lebovic DI, Garrett E, Taylor RN. Neutrophils infiltrating the endometrium express vascular endothelial growth factor: potential role in endometrial angiogenesis. *Fertil Steril*. 2000;74(1):107-12.

Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JL, Dunselman GA. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(2):233-44.

Ndhlovu LC, Snyder-Cappione JE, Carvalho KI, Leal FE, Loo CP, Bruno FR, Jha AR, Devita D, Hasenkrug AM, Barbosa HM, Segurado AC, Nixon DF, Murphy EL, Kallas EG. Lower numbers of circulating Natural Killer T (NK T) cells in individuals with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated neurological disease. *Clin Exp Immunol*. 2009 Dec;158(3):294-9.

Nezhat C, Nezhat F, Nezhat C. Endometriosis: ancient disease, ancient treatments. *Fertil Steril*. 2012;98(6 Suppl):S1-62.

Niemeyer M, Darmoise A, Mollenkopf HJ, Hahnke K, Hurwitz R, Besra GS, et al. Natural killer T-cell characterization through gene expression profiling: an account of versatility bridging T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses. *Immunology*. 2008;123(1):45-56.

Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997;68(4):585-96.

Nnoaham KE, Hummelshoj L, Kennedy SH, Jenkinson C, Zondervan KT, World Endometriosis Research Foundation Women's Health Symptom Survey C. Developing symptom-based predictive models of endometriosis as a clinical screening tool: results from a multicenter study. *Fertil Steril*. 2012;98(3):692-701 e5.

Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril*. 2011;96(2):366-73 e8.

O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha- invariant natural killer T cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e28648.

Oishi Y, Sumida T, Sakamoto A, Kita Y, Kurasawa K, Nawata Y, et al. Selective reduction and recovery of invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2001;28(2):275-83.

Onoe K, Yanagawa Y, Minami K, Iijima N, Iwabuchi K. Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells. *Immunol Res*. 2007;38(1-3):319-32.

Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24(2):219-33.

Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2011;65(1):1-10.

Osuga Y, Hirota Y, Hirata T, Takamura M, Urata Y, Harada M, Izumi G, Fujii T, Koga K. Th2 cells and Th17 cells in the development of endometriosis – possible roles of interleukin-4 and interleukin-17A. *J Endometr Pelvic Pain Disord.* 2016;8(4):136-40.

Othman Eel-D, Hornung D, Salem HT, Khalifa EA, El-Metwally TH, Al-Hendy A. Serum cytokines as biomarkers for nonsurgical prediction of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;137(2):240-6.

Patel BG, Lenk EE, Lebovic DI, Shu Y, Yu J, Taylor RN. Pathogenesis of endometriosis: Interaction between Endocrine and inflammatory pathways. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;50:50-60.

Patel BG, Rudnicki M, Yu J, Shu Y, Taylor RN. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017;96(6):623-32.

Pencovich N, Luk J, Hantisteanu S, Hornstein MD, Fainaru O. The development of endometriosis in a murine model is dependent on the presence of dendritic cells. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(4):515-21.

Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Jr., Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1373-9.

Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C, Oliveira RM, Baracat EC, Abrao MS. Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(1):92-8.

Quaglino P, Bergallo M, Ponti R, Barberio E, Cicchelli S, Buffa E, et al. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. *Dermatology*. 2011;223(1):57-67.

Rakhila H, Al-Akoum M, Bergeron ME, Leboeuf M, Lemyre M, Akoum A, Pouliot M. Promotion of angiogenesis and proliferation cytokines patterns in peritoneal fluid from women with endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2016;116:1-6.

Ramanarayanan MP. Immunoglobulins and the immune system. *Otolaryngol Clin North Am*. 1985;18(4):627-47.

Riazi H, Tehranian N, Ziaei S, Mohammadi E, Hajizadeh E, Montazeri A. Clinical diagnosis of pelvic endometriosis: a scoping review. *BMC Womens Health*. 2015;15:39.

Rothstein DM, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(4):376-84.

Salmassi A, Acil Y, Schmutzler AG, Koch K, Jonat W, Mettler L. Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*. 2008;89(5 Suppl): 1578-84.

Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol*. 1927;3(2):93-110 43.

- Santodomingo-Garzon T, Swain MG. Role of NKT cells in autoimmune liver disease. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):793-800.
- Scarselli G, Rizzello F, Cammilli F, Ginocchi L, Coccia ME. Diagnosis and treatment of endometriosis. A review. *Minerva Ginecol.* 2005;57(1):55-78.
- Serrano Hernandez A. [Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin.* 2009;5 Suppl 1:1-5.
- Shi YH, Shi GC, Wan HY, Jiang LH, Ai XY, Zhu HX, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. *Chin Med J (Engl).* 2011;124(13):1951-6.
- Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(8):3112-8.
- Sidobre S, Naidenko OV, Sim BC, Gascoigne NR, Garcia KC, Kronenberg M. The V alpha 14 NKT cell TCR exhibits high-affinity binding to a glycolipid/CD1d complex. *J Immunol.* 2002;169(3):1340-8.
- Sieling PA. CD1-Restricted T cells: T cells with a unique immunological niche. *Clin Immunol.* 2000;96(1):3-10.
- Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z, Strzelczyk J. Peripheral blood proinflammatory response in women during menstrual cycle and endometriosis. *Cytokine.* 2015 Dec;76(2):117-122.
- Silverstein AM. Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute. *Nat Immunol.* 2003;4(5):425-8.

Sinkovics JG, Horvath JC. Human natural killer cells: a comprehensive review. *Int J Oncol*. 2005;27(1):5-47.

Snyder-Cappione JE, Loo CP, Carvalho KI, Kuylensstierna C, Deeks SG, Hecht FM, Rosenberg MG, Sandberg JK, Kallas EG, Nixon DF. Lower cytokine secretion ex vivo by natural killer T cells in HIV-infected individuals is associated with higher CD161 expression. *AIDS*. 2009;23(15):1965-70.

Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Loo CP, Chapman JM, Meiklejohn DA, Melo FF, et al. Individuals with pulmonary tuberculosis have lower levels of circulating CD1d-restricted NKT cells. *J Infect Dis*. 2007;195(9):1361-4.

Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B, Candiani M, Busacca M, Di Blasio AM, et al. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36(5):295-300.

Stanic AK, Kim M, Styer AK, Rueda BR. Dendritic cells attenuate the early establishment of endometriosis-like lesions in a murine model. *Reprod Sci*. 2014;21(10):1228-36.

Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ, 3rd. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril*. 1982;38(6):667-72.

Szymanowski K, Niepsuj-Biniaś J, Dera-Szymanowska A, Wołuń-Cholewa M, Yantczenko A, Florek E, Opala T, Murawski M, Wiktorowicz K. An influence of immunomodulation on Th1 and Th2 immune response in endometriosis in an animal model. *Biomed Res Int*. 2013;2013:849492.

Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*. 2015;72(2):146-53.

Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1164-5.

Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C. Natural Killer Cells: Key Players in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(4):291-301.

Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, et al. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(3):1118-22.

van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, et al. Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*. 2002;168(3):1490-5.

Vargas-Rojas MI, Solleiro-Villavicencio H, Soto-Vega E. Th1, Th2, Th17 and Treg levels in umbilical cord blood in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015:1-4.

Vercellini P, Fedele L, Aimi G, Pietropaolo G, Consonni D, 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(1):266-71.

Vercellini P, Vigano P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(5):261-75.

Viale R, Ware R, Maricic I, Chaturvedi V, Kumar V. NKT Cell Subsets Can Exert Opposing Effects in Autoimmunity, Tumor Surveillance and Inflammation. *Curr Immunol Rev*. 2012;8(4):287-96.

Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;96(1):21-34.

Whitcomb BW, Mumford SL, Perkins NJ, Wactawski-Wende J, Bertone-Johnson ER, Lynch KE, Schisterman EF. Urinary cytokine and chemokine profiles across the menstrual cycle in healthy reproductive-aged women. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1383-91.

Xia T, Zheng XF, Qian BH, Fang H, Wang JJ, Zhang LL, et al. Plasma Interleukin-37 Is Elevated in Patients with Rheumatoid Arthritis: Its Correlation with Disease Activity and Th1/Th2/Th17-Related Cytokines. *Dis Markers*. 2015;2015:795043.

Yanagihara Y, Shiozawa K, Takai M, Kyogoku M, Shiozawa S. Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 1999;118(1):131-6.

Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(7):1274-81.

Zeng SG, Ghnewa YG, O'Reilly VP, Lyons VG, Atzberger A, Hogan AE, et al. Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production, and T cell stimulation by B cells in vitro. *J Immunol*. 2013;191(4):1666-76.

Zhang C, Xiao C, Wang P, Xu W, Zhang A, Li Q, et al. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. *Hum Immunol*. 2014;75(4):289-96.

Zhao Y, Gong P, Chen Y, Nwachukwu JC, Srinivasan S, Ko C, Bagchi MK, Taylor RN, Korach KS, Nettles KW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Dual suppression of estrogenic and inflammatory activities for targeting of endometriosis. *Sci Transl Med*. 2015;7(271):271ra9.

Zola H. Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1(3):375-83.